

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**“Patrones de polimorfismo molecular y morfológico de  
Megalobulimus (mollusca, gastropoda) en el sur de los  
Andes del Perú”**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magister en Biología Molecular

**AUTOR**

Victor Octavio Borda Pua

Lima – Perú

2014



**Ricardo Siri Liniers**

***A María Claudia y Alexandra,  
Verdaderos motivos para continuar***

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanas y a las tres pequeñas por ser siempre el mayor de los apoyos en la realización de cada proyecto que me envuelve, por toda la paciencia y los consejos día a día. Con ellos cada momento es irremplazable.

A Esther de la Fuente, quien siempre, siempre está ahí, apoyándome de todas las maneras posibles.

A la Dra. Rina Ramírez, quien con sus sabias palabras y apoyo incondicional supo guiarme desde mis inicios en las ciencias biológicas y así por delante.

A Dominique Maldonado, André Ampuero, Pedro Romero y Jorge Ramirez, amigos del departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la UNMSM y del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía, quienes siempre estuvieron prestos a escuchar, discutir acerca de moluscos, evolución y compartir la pizza de los martes. A Nora Ruiz, por todo el apoyo brindado hasta en los menores detalles. A Natali Hurtado por las observaciones. A Víctor Jiménez y Sally Molero del Laboratorio de Sistemática molecular y Filogeografía, quienes me apoyaron grandemente en el trabajo de laboratorio. A Carol Landau por su invaluable ayuda en las colectas en Huancavelica, así como también a Alfredo Guzman.

A la doctora Suzete Gomes por su invaluable apoyo en la estructuración del proyecto y además por el apoyo económico.

A la Mg. Cynthia Asorey, quien ha apoyado de manera incondicional al desarrollo de esta tesis, durante el análisis y la elaboración de locas teorías.

A los doctores Juan Pablo Torres Flores y Juan Opazo, quienes me ayudaron a entender cómo actúa la evolución.

A Flor Gómez y Juan Tito, amigos quienes me apoyaron durante mi estancia en la hermosa ciudad del Cusco.

A Delia Quintanilla y todas las demás personas que me apoyaron durante el desarrollo de esta tesis, mis disculpas por no recordar todos los nombres, pero su invaluable esfuerzo se plasma en esta tesis.

Agradezco a la Fundación Rufford, la cual financió el proyecto “Project 11451-1 – Conservation of giant land snails from Southeastern Peru” a mi cargo por el cual fue posible financiar la mayor parte del proyecto.

Finalmente agradezco al Vicerrectorado de Investigación el cual al financiar el proyecto UNMSM-VRI-CSI Proyecto CON-CON N°: 121001071 permitió el desarrollo de la fase inicial de la presente tesis.

A todos, gracias

...



## **INDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1. Vertiente Oriental de los Andes	4
2.2. Los moluscos como modelo de estudio	5
2.3. La Familia Strophocheilidae en el Perú	7
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
3.1. HIPÓTESIS	11
3.2. OBJETIVOS	11
3.2.1. Objetivo general	11
3.2.2. Objetivos específicos	11
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
4.1. Muestreo	12
4.2. Revisión de las colecciones científicas	17
4.3. Discriminación morfológica	17
4.3.1. Análisis morfométrico	17
4.3.2. Análisis morfológico	19
4.4. Análisis Molecular	21
4.4.1. Extracción, amplificación y secuenciamiento	21
4.4.2. Edición y alineamiento múltiple	22
4.4.3. Caracterización de las secuencias	23
4.4.4. Diversidad genética	23
4.4.5. Redes de haplotipos	24
4.4.6. Patrones demográficos	25
4.4.7. Posición evolutiva de las especies dentro de la Subfamilia Megalobuliminae	27
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
5.1. Revisión de las colecciones científicas y literatura	30
5.2. Morfometría	36
5.2.1. Morfometría clásica	36
5.2.2. Morfometría geométrica	39
5.3. Morfología	47
5.4. Análisis molecular	61
5.4.1. Marcador mitocondrial RNA ribosomal subunidad 16S (16S rRNA)	61
5.4.1.1. Amplificación y descripción de las secuencias	61
5.4.1.2. Distancia genética entre especies de	

	<i>Megalobulimus</i>	63
5.4.1.3.	Diversidad genética	66
5.4.1.4.	Red de haplotipos	69
5.4.1.5.	Análisis de <i>mismatch distribución</i>	70
5.4.1.6.	Parámetros demográficos del DNA	71
5.4.2.	Marcador mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI)	71
5.4.2.1.	Descripción de las secuencias	71
5.4.2.2.	Distancia genética entre especies de <i>Megalobulimus</i>	73
5.4.2.3.	Diversidad genética	76
5.4.2.4.	Red de haplotipos	79
5.4.2.5.	Análisis de <i>mismatch distribución</i>	81
5.4.2.6.	Parámetros demográficos del DNA	81
5.4.3.	Marcador concatenados	82
5.4.3.1.	Diversidad genética	82
5.4.3.2.	Red de haplotipos	83
5.4.3.3.	Análisis de <i>mismatch distribución</i>	84
5.5.	Evaluación filogenética	85
5.5.1.	Alineamiento	85
5.5.2.	Grado de saturación de las secuencias	86
5.5.3.	Análisis filogenético	87
6.	DISCUSIÓN	92
6.1.	Conquiología y Morfometría, implicancias en la Taxonomía de <i>Megalobulimus</i>	93
6.2.	Efecto de la variabilidad morfológica en la determinación de especies	96
6.3.	Evolución de las poblaciones de los taxa en estudio	98
6.4.	Relaciones evolutivas dentro del género <i>Megalobulimus</i>	101
6.5.	Estatus taxonómico	103
7.	CONCLUSIONES	105
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
9.	ANEXO	119

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Procedencia de los especímenes colectados en el presente estudio.....	<b>16</b>
<b>Tabla 2.</b> Taxa usados en las filogenias moleculares basadas en el marcador mitocondrial 16S rRNA. Las 30 secuencias se encuentran en el GenBank y proceden de Ramírez <i>et al.</i> (2012) (1), Jaramillo <i>et al.</i> (2014) (2), Rowson <i>et al.</i> (2011) (3), Moussalli <i>et al.</i> (2009) (4).....	<b>29</b>
<b>Tabla 3.</b> Matriz de estructura del Análisis de Componentes Principales para 98 conchas de las especies en estudio.....	<b>37</b>
<b>Tabla 4.</b> Cinco primeras componentes para el Análisis de Componentes Principales basado en variables de forma a partir 98 conchas para la discriminación entre las tres subespecies de <i>Megalobulimus leucostoma</i> así como <i>Megalobulimus</i> sp. 1, <i>Megalobulimus</i> sp. 2 y <i>Megalobulimus anae</i> . Se indica el porcentaje de varianza para cada componente así como la varianza acumulada.....	<b>40</b>
<b>Tabla 5.</b> Matriz de estructura de las cinco primeras componentes principales para las coordenadas de los 12 <i>landmarks</i> basados en variables de forma de 98 conchas para la discriminación entre las tres subespecies de <i>Megalobulimus leucostoma</i> , así como <i>Megalobulimus</i> sp 1, <i>Megalobulimus</i> sp 2 y <i>Megalobulimus anae</i> .....	<b>42</b>
<b>Tabla 6.</b> P-values de pares de grupos para las tres subespecies de <i>Megalobulimus leucostoma</i> y <i>Megalobulimus</i> sp 2 producto del MANOVA no paramétrico a partir de los valores de las tres primeras componentes principales basadas en variables de forma. Se considerando dos valores de distancia (Euclidiana y de Mahalanobis). El asterisco (*) indica los valores significativos.....	<b>45</b>
<b>Tabla 7.</b> Medidas de los especímenes de <i>M. leucostoma leucostoma</i> . Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.....	<b>49</b>
<b>Tabla 8.</b> Medidas de los especímenes de <i>Megalobulimus</i> sp. 1. Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.....	<b>55</b>
<b>Tabla 9.</b> Medidas de los especímenes de <i>Megalobulimus</i> sp. 2. Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.....	<b>58</b>
<b>Tabla 10.</b> Promedio de la frecuencia de bases de las secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA. T= Timina, C=Citosina, A=Adenina, G= Guanina, Tam (pb)= Tamaño en pares de bases, N= Número de secuencias.....	<b>62</b>
<b>Tabla 11.</b> Resultados de la evaluación de las secuencias de 16S rRNA de los taxa en estudio, realizada con la herramienta nBLAST en el GenBank.....	<b>62</b>

<b>Tabla 12.</b> Distancia genética a pares corregida (Kimura 2 parámetros) del marcador mitocondrial 16S rRNA dentro y entre tres taxa en estudio.....	<b>65</b>
<b>Tabla 13.</b> Lista de especímenes de <i>M leucostoma leucostoma</i> indicando procedencia, haplotipo (H) perteneciente y posiciones variables para el marcador mitocondrial 16S rRNA. T= Timina, A=Adenina, G= Guanina, C=Citosina, (.) =nucleótido similar, (-) = gap.....	<b>68</b>
<b>Tabla 14.</b> Promedios de la frecuencia de bases de las secuencias del marcador mitocondrial COI. T= Timina, C=Citosina, A=Adenina, G= Guanina, Tam (pb)= Tamaño en pares de bases, N= Número de secuencias.....	<b>72</b>
<b>Tabla 15.</b> Resultados de la comparación de dos secuencias de COI de los taxa en estudio con la herramienta nBLAST, en el GenBank. Se muestran los resultados con mayores valores obtenidos para cada uno de los taxa indicados.....	<b>73</b>
<b>Tabla 16.</b> Distancia genética a pares corregida (Kimura 2 parámetros) basada en el marcador mitocondrial COI dentro y entre cada subespecie.....	<b>76</b>
<b>Tabla 17.</b> Lista de especímenes de <i>M. leucostoma leucostoma</i> indicando procedencia, haplotipo (H) perteneciente y posiciones variables para el marcador mitocondrial COI. T= Timina, A=Adenina, G= Guanina, C=Citosina, (.) =nucleótido similar.....	<b>78</b>
<b>Tabla 17.</b> (Continuación).....	<b>79</b>

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Lugares de colecta de <i>Megalobulimus leucostoma leucostoma</i> , en la provincia de La Convención en el departamento del Cusco. Los ríos están diferenciados como líneas en azul.....	<b>13</b>
<b>Figura 2.</b> Mapa de procedencia del material evaluado (Suroriente del Perú) para <i>M. leucostoma leucostoma</i> , <i>Megalobulimus</i> sp 1 y <i>Megalobulimus</i> sp 2. Se observan los departamentos de Cusco, Puno y Huancavelica. Los ríos están diferenciados como líneas en azul.....	<b>14</b>
<b>Figura 3.</b> Especímenes colectados en la provincia de La Convención en el Dpto de Cusco (A) <i>Megalobulimus leucostoma</i> colectado en el distrito de Santa Ana. (B) Vista panorámica del poblado de Echarate. (C) <i>M. leucostoma</i> levógiro colectado en la localidad de Huayanay. (D) <i>M. florezi</i> colectado en la localidad de Pavayoc.....	<b>15</b>
<b>Figura 4.</b> Variables de la concha consideradas para el análisis morfométrico. (A) AC: Altura de la concha. DM: Diámetro mayor de la concha DL: Diámetro lateral. LB: Largo de la abertura. AB: Ancho de la abertura. ESP: Espira. PDM: Posición del diámetro mayor. (B) <i>Landmarks</i> utilizados en el estudio basados en Schilthuizen & Haase	

(2010). Individuos procedentes de Pavayoc, Provincia de la Convención, Cusco.  
..... 19

**Figura 5.** Subespecies de *Megalobulimus leucostoma* en vista frontal y lateral. (A) y (B) *M. leucostoma leucostoma* procedente de Echarate, Cusco. (C) y (D) *Megalobulimus* sp 1 procedente de Carabaya, Puno. .... 32

**Figura 6.** *Helix mathiusii* d'Orbigny 1835, sinonimia para *Megalobulimus leucostoma leucostoma*, sintipo procedente de Perú. Código de espécimen 1854.12.4.214 custodiado NHMUK. Cortesía de NHMUK. .... 33

**Figura 7.** *Strophocheilus leucostoma weyrauchi* Bequaert, 1949, Holotipo de *Megalobulimus leucostoma weyrauchi*. Código de espécimen 166295, custodiado MCZ. Cortesía de MCZ. .... 34

**Figura 8.** *Helix lacunosus* d'Orbigny, 1835, sinonimia para *Megalobulimus leucostoma lacunosus*, sintipo procedente de la localidad de Tutulima, Cochabamba, Bolivia. Código de espécimen 1854.12.4.213 custodiado NHMUK. Cortesía de NHMUK. .... 34

**Figura 9.** *Megalobulimus anae* (Pilsbry) procedente de la localidad de Quillabamba custodiado en el Florida Museum of Natural History (Nº203086). .... 35

**Figura 10.** Concha de *Megalobulimus* sp 2 procedente de la localidad de Pichiu, dpto. de Huancavelica. .... 35

**Figura 11.** Análisis de componentes principales basado en seis medidas obtenidas a partir de 98 conchillas para la discriminación entre las ejemplares tipo de las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma* así como de *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *Megalobulimus anae*. El porcentaje de variación para cada componente se indica entre paréntesis. .... 39

**Figura 12.** Análisis de componentes principales basado en variables de forma para la discriminación entre los ejemplares tipo de las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma*, así como *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp 2 y *Megalobulimus anae*. El porcentaje de variación para cada componente se indica entre paréntesis. .... 43

**Figura 13.** Análisis discriminante basado en las tres primeras componentes producto del ACP para las variables de forma entre las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma*, así como *Megalobulimus* sp 1, *Megalobulimus* sp 2 y *Megalobulimus anae*. El porcentaje de variación para cada factor discriminante se indica entre paréntesis. .... 46

**Figura 14.** Sistema reproductor de *M. leucostoma leucostoma*. Individuos procedentes de la localidad de Sambaray, provincia de La Convención, departamento del Cusco (A) Genitalia completa. (B) Superficie interna del espermoviducto, oviducto libre y vagina. (C) Superficie interna del epífalo y pene. .... 52

**Figura 15.** Variabilidad de la superficie interna de la genitalia femenina en especímenes de *M. leucostoma* procedentes de Cusco. (A) y (B) Pavayoc, (C), (D) y (E) Huyro, (F) Santa María, (G) Chaullay, (H) Sambaray y (I) Echarate.....**53**

**Figura 16.** Variabilidad de la superficie interna de la genitalia masculina en especímenes de *M. leucostoma* procedentes de Cusco. (A) y (B) Pavayoc, (C), (D) y (E) Huyro, (F) Santa María, (G) Chaullay, (H) Sambaray y (I) Echarate.....**54**

**Figura 17.** Sistema reproductor de *Megalobulimus* sp 1 procedente de la provincia de Carabaya, departamento de Puno. (A) Genitalia completa. (B) Superficie interna del espermoviducto, oviducto libre y vagina. (C) Superficie interna del epífalo y pene.....**57**

**Figura 18.** Sistema reproductor de *Megalobulimus* sp 2. Individuo procedente de la localidad de Pichiu, provincia de Tayacaja, departamento de Huancavelica. (A) Genitalia completa. (B) Superficie interna del espermoviducto, oviducto libre y vagina. (C) Superficie interna del epífalo y pene.....**60**

**Figura 19.** Gel de electroforesis de amplificados para el marcador 16S RNA de *M. leucostoma*, se observa que todos los carriles muestran la presencia del marcador con un tamaño entre 300 y 400 pb.....**61**

**Figura 20.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S rRNA para los especímenes de *M. leucostoma leucostoma*, *M. florezi*, *Megalobulimus* sp 1 y *Megalobulimus* sp 2 en el programa Clustal x2, entre los sitios 70 y 170. Los recuadros de borde negro indican la presencia de gaps en los primeros 180 nucleótidos.....**64**

**Figura 21.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S rRNA para los especímenes de *M. leucostoma leucostoma*, *M. florezi*, *Megalobulimus* sp 1 y *Megalobulimus* sp 2 en el programa Clustal x2 entre los sitios 210 y 320. Los recuadros de borde negro indican la presencia de gaps.....**64**

**Figura 22.** Gráfica de transiciones (s) y transversiones (v) para el marcador mitocondrial 16s rRNA para los individuos de *M. leucostoma leucostoma* comparadas con la distancia genética corregida Kimura 2 parámetros (K80).....**66**

**Figura 23.** Red de haplotipos para *Megalobulimus leucostoma leucostoma* basada en el marcador mitocondrial 16S rRNA. Las 40 secuencias analizadas están agrupadas en siete haplotipos. Los colores representan la proporción de individuos de las localidades: Huyro, Pavayoc, Santa María, Sambaray, Uchumayo, Huayanay, Echarate, Chaullay y Potrero. El haplotipo H2 es el de mayor frecuencia y ocupa posición central. La escala representa el número de secuencias. Cada línea representa una mutación de distancia entre las secuencias.....**69**

**Figura 24.** Gráfica de distribución de diferencias a pares entre las secuencias de los individuos de *M. leucostoma leucostoma* en base al marcador mitocondrial 16S rRNA.  
.....**70**

<b>Figura 25.</b> Gel de electroforesis de amplificadores para el marcador COI de <i>M. leucostoma</i> , se observan carriles que muestran la presencia del marcador con un tamaño entre 700 y 800 pb.	<b>72</b>
<b>Figura 26.</b> Región inicial del alineamiento múltiple de las secuencias del gen COI para los especímenes de <i>M. leucostoma leucostoma</i> , <i>Megalobulimus</i> sp 1, <i>Megalobulimus</i> sp 2 y <i>M. florezi</i> en el programa Clustal x2. Se observan los primeros 120 nucleótidos.	<b>74</b>
<b>Figura 27.</b> Región terminal del alineamiento múltiple de las secuencias del gen COI para los especímenes de <i>M. leucostoma leucostoma</i> , <i>Megalobulimus</i> sp 1, <i>Megalobulimus</i> sp 2 y <i>M. florezi</i> en el programa Clustal x2. Se observan los últimos 120 nucleótidos.	<b>74</b>
<b>Figura 28.</b> Gráfica de transiciones (s) y transversiones (v) para el marcador mitocondrial COI de los individuos de <i>M. leucostoma leucostoma</i> comparadas con la distancia corregida Kimura 2 parámetros (K80).	<b>75</b>
<b>Figura 29.</b> Alineamiento de las secuencias traducidas para el marcador mitocondrial COI en <i>M. l. leucostoma</i> . Se observa similitud entre la gran mayoría de secuencias obtenidas, además el rectángulo y el círculo encierran los cambios en la secuencia aminoacídica Metionina-Valina y Glicina-Alanina, respectivamente.	<b>77</b>
<b>Figura 30.</b> Red de haplotipos para <i>Megalobulimus leucostoma leucostoma</i> basada en el marcador mitocondrial COI. Se observan quince haplotipos que proceden de 30 secuencias. Los colores representan la proporción de individuos de las localidades: Huyro, Pavayoc, Santa María, Sambaray, Uchumayo, Huayanay, Echarate y Chaullay. El haplotipo H2 es el de mayor frecuencia. La escala representa número de secuencias. Cada línea representa una mutación de distancia entre las secuencias.	<b>80</b>
<b>Figura 31.</b> Gráfica de distribución de diferencias a pares entre las secuencias del marcador mitocondrial COI en <i>M. leucostoma leucostoma</i> .	<b>81</b>
<b>Figura 32.</b> Red de haplotipos para <i>Megalobulimus leucostoma leucostoma</i> basada en los marcadores concatenados 16S rRNA y COI a partir de 30 individuos. Los colores representan localidades: Huyro, Pavayoc, Santa María, Sambaray, Uchumayo, Huayanay, Echarate y Chaullay. Las líneas entre los puntos indican una mutación de distancia.	<b>83</b>
<b>Figura 33.</b> Gráfica de distribución de diferencias a pares entre las secuencias para los individuos de <i>M. leucostoma leucostoma</i> en base a los marcadores concatenados.	<b>84</b>
<b>Figura 34.</b> Primeros 120 nucleótidos del alineamiento de 39 secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA de individuos del género <i>Megalobulimus</i> y tres especies empleadas como grupos externos.	<b>85</b>

**Figura 35.** Últimos 120 nucleótidos del alineamiento de 39 secuencias de individuos del género *Megalobulimus* y tres especies empleadas como grupos externos para el marcador mitocondrial 16S rRNA. ....86

**Figura 36.** Transiciones y transversiones comparadas contra las distancias a pares entre las secuencias 16S rRNA de *Megalobulimus* y tres grupos externos. s= transiciones, v = transversiones. El modelo de substitución nucleotídica para corrección de la distancia fue Kimura 2 parámetros (K80). ....87

**Figura 37.** Árbol filogenético de ML empleando el marcador 16S rRNA para 11 especies de *Megalobulimus*. . El clado A esta indicado con las ramas rojos y el clado B con las ramas azules. Los taxa en estudio están indicados con coloración verde. Se muestra el soporte de *bootstrap* en los nodos. La escala representa distancias genéticas en sustituciones de nucleótidos por sitio. ....90

**Figura 38.** Árbol filogenético de IB empleando el marcador 16S rRNA para 11 especies de *Megalobulimus*. . El clado A esta indicado con las ramas rojos y el clado B con las ramas azules. Los taxa en estudio están indicados con coloración verde. El número junto a los nodos indica la probabilidad posterior para el análisis bayesiano. La escala representa distancias genéticas en sustituciones de nucleótidos por sitio. ....91



## RESUMEN:

La vertiente oriental de los Andes es el área con mayor biodiversidad en el mundo. *Megalobulimus* agrupa a las especies de moluscos terrestres neotropicales de mayor tamaño. Es en el sur de los Andes orientales donde habitan más de la mitad de especies de este género, los cuales son blanco de dos problemáticas importantes; la primera se refiere a la pobre discriminación entre especies, y la segunda sobre la variabilidad intraespecífica, tanto a nivel morfológico como molecular. El objetivo de esta tesis fue evaluar los patrones de polimorfismo molecular y morfológico de *Megalobulimus* del sureste de los Andes del Perú y determinar sus relaciones evolutivas con otras especies del género.

Se emplearon cuatro taxa del género *Megalobulimus*: *M. leucostoma*, *M. florezi*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2. Se realizó la revisión de especímenes tipo, análisis morfométricos de la concha, análisis de la genitalia, la evaluación de marcadores mitocondriales (16S rRNA y COI) y de filogenia molecular. La revisión de los ejemplares tipo demostró inconsistencias en el estatus de las subespecies de *M. leucostoma*. *M. l. lacunosus* se muestra muy diferente del típico *leucostoma* mientras que *M. l. weyrauchi* se mantiene muy similar. El análisis morfométrico de la concha sustenta esta idea, siendo el tamaño de la espira la principal diferencia. Características morfológicas (superficie interna del pene y oviducto libre) y moleculares (distancias genéticas) muestran que los taxa *Megalobulimus* sp.1 y *Megalobulimus* sp. 2 son entidades diferentes a otras especies de *Megalobulimus* previamente descritas. *M. florezi* presenta el mismo haplotipo que *M. capillaceus* para el marcador mitocondrial 16S rRNA aunque las diferencias morfológicas son contrastantes. El análisis poblacional de *M. l. leucostoma* mediante los marcadores 16S rRNA y COI reveló diferentes patrones demográficos que podrían ser explicados por diferentes presiones evolutivas sobre estos marcadores.

El análisis filogenético basado en el marcador 16S rRNA dividió al género *Megalobulimus* en dos clados (A y B) y sugiere que las similitudes en la concha no son

evidencia de un mismo origen evolutivo. Con respecto al clado B, se observó una tendencia de diversificación hacia el norte de los Andes, pero con bajo soporte estadístico.

En conclusión, los resultados sugieren que *M. l. lacunosus* sería considerada una entidad independiente de *M. leucostoma*, mientras que *M. l. weyrauchi* pasaría a ser una sinonimia de *M. leucostoma*. Además, los análisis morfológicos y moleculares sugieren que *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2 deben ser consideradas como especies nuevas. Finalmente, para *Megalobulimus*, los caracteres basados en la concha y la genitalia podrían ser consideradas para la diagnosis de las especies pero no como sinapomorfias.

**Palabras clave:** 16S rRNA, COI, genitalia, filogenia, morfometría.

## ABSTRACT:

The eastern slope of Andes is the major center for biodiversity. The genus *Megalobulimus* has the biggest land snails in Neotropics and has more than half of total species in the southeastern Andes. Its species are target of different issues like taxonomic problems that imply poor discrimination between species and at intra-specific level. The main goal of this thesis was to evaluate the patterns of both molecular and morphological polymorphisms of *Megalobulimus* from the southeastern Andes from Peru and to determinate their evolutionary relationships with other species of the genus.

It was employed four taxa of *Megalobulimus*: *M. leucostoma*, *M. florezi*, *Megalobulimus* sp. 1 and *Megalobulimus* sp. 2. It was performed a revision of type specimens, classic and geometrical morphometrics, anatomical descriptions, analysis of two mitochondrial markers (16S rRNA and COI) and molecular phylogenetics. Revision of type specimens reveals inconsistency in the status of the subspecies of *M. leucostoma*, *M. l. lacunosus* is quite different from typical *leucostoma* but *M. l. weyrauchi* is not. Morphometric analysis of shell supports this idea and the spire height is the principal difference. The morphological (penis and free oviduct features) and molecular (genetic distances) analyses showed that both *Megalobulimus* sp. 1 and *Megalobulimus* sp. 2 are independent entities from other *Megalobulimus* species already described. *M. florezi* and *M. capillaceus* share the same haplotype for 16S rRNA even though their morphological differences. The population analyses with 16S rRNA and COI of *M. l. leucostoma* reveal different demographic patterns that could be explained by the different evolutionary pressure on these markers. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA divides *Megalobulimus* in two clades (A and B) and suggests that shell similarities are not evidence of the same evolutionary origin. For clade B, there is a tendency that shows a northward diversification in Andes but with low statistical support.

In conclusion, the results suggest that *M. l. lacunosus* would be considered as an independent entity from *M. leucostoma*; that *M. l. weyrauchi* is not an independent

entity from typical *leucostoma* and would be considered as a synonymy of *M. leucostoma*. In addition, the morphological and molecular analyses suggest that *Megalobulimus* sp. 1 and *Megalobulimus* sp. 2 should be considered as new species. Finally, for *Megalobulimus*, characters based on shell and genitalia could be considered for species diagnosis but not as synapomorphies.

**Key words:** 16S rRNA, COI, genitaly, phylogeny, morphometrics,

## 1. INTRODUCCIÓN

La investigación sobre el origen de las especies existentes no es sólo de interés ecológico y evolutivo, sino también es necesaria para el desarrollo de estrategias de conservación de la biodiversidad (Rull, 2007). En este sentido, los patrones de diversidad genética y variación morfológica son de gran importancia en la comprensión de los procesos evolutivos que originan la diversificación de las especies (Chaves y Smith, 2011). La determinación de estos procesos es uno de los mayores retos para las ciencias biológicas.

Dentro del neotrópico, la vertiente oriental de los Andes es considerada una de las zonas con mayor diversidad biológica en el mundo y que se encuentra constantemente en cambio (Swenson *et al.*, 2012). Diversos estudios han desarrollado esfuerzos por determinar la composición de especies y distribución de éstas en un área tan megadiversa como el suroriente del Perú (Graves, 1988; Duellman, 1999; Pacheco *et al.*, 2011). Dentro de esta área, el conocimiento sobre la fauna de invertebrados es escaso, sobre todo en moluscos.

Los moluscos son el grupo animal con mayor diversidad después de los artrópodos (Ramírez *et al.*, 2003). Dicha diversidad se ve reflejada en un sinnúmero de formas, tamaños y roles que desempeñan dentro de los ecosistemas (Lydeard *et al.*, 2004). Aun así, es escasa la información que se tiene sobre sus relaciones filogenéticas y ecológicas, en los ecosistemas tropicales. Por tal motivo, existe una urgente necesidad de conocer y entender la diversidad de moluscos terrestres (Solem, 1984). Dentro de esta diversidad de especies urge, no sólo un estudio de variación interespecífica, sino también conocer la variabilidad intraespecífica ya que esto ayuda a elucidar los procesos que promueven la diversidad y que la mantienen (Masta y Maddison, 2002; García-París *et al.*, 2003; Steppan *et al.*, 2003).

Los moluscos han sido empleados como modelo de estudios evolutivos y ecológicos con relevancia a la hora de establecer prioridades de conservación

(Davison, 2002; Hugall *et al.*, 2002). La mayoría de las descripciones de las especies de moluscos está basada en las características de la conchilla (Pfeiffer, 1855; Martens, 1876; Pilsbry, 1895; Dall, 1912; Pilsbry, 1940; Bequaert, 1948; Breure, 1979). Si bien existen moluscos terrestres cuya discriminación entre especies mediante la concha es eficiente, existen especies cuya variabilidad conquiológica es tan amplia que hace necesario el empleo de nuevos caracteres para establecer una correcta discriminación (Leme, 1973).

La Subfamilia Megalobuliminae (Leme) (Familia Strophocheilidae) es un buen ejemplo de la premisa anterior. Es una subfamilia monogenérica que agrupa a las especies de moluscos terrestres de mayor tamaño en la región neotropical. El tamaño y la exquisitez de la carne de estas especies han favorecido su consumo por parte de las poblaciones nativas de la amazonia peruana (Flórez, 1970; Ramírez y Cáceres, 1991). Este género presenta 67 especies descritas para el neotrópico (Ramírez *et al.*, 2012). Existe una controversia sobre la nominación correcta de algunas especies ya que los caracteres conquiológicos, en los cuales se basa su descripción, resultan ser muy plásticos (Bequaert, 1948). Para la vertiente oriental de los Andes peruanos se han reportado cuatro especies de *Megalobulimus* (Miller): *M. popelairianus* (Nyst, 1845), *M. maximus* (Sowerby, 1825), *M. leucostoma* (Sowerby, 1835) y *M. florezi* Borda & Ramírez, 2013. Las dos primeras son simpátricas en el departamento de Madre de Dios (Ramírez *et al.*, 2012) y las dos últimas son también simpátricas que habitan en la cuenca del río Vilcanota.

En el caso de *M. leucostoma*, esta especie agrupa tres subespecies, *M. l. leucostoma* (Sowerby, 1835), *M. l. weyrauchi* (Bequaert, 1949) y *M. l. lacunosus* (d'Orbigny, 1835). Las dos primeras han sido descritas para el norte del departamento del Cusco, mientras que la última se distribuye en Puno y Bolivia. El estatus taxonómico de *M. leucostoma*, como lo organizó Bequaert (1949), es dudoso ya que las diferencias descritas no son claras.

*Megalobulimus florezi* ha sido descrita recientemente a partir de poblaciones asignadas a *M. capillaceus*, una especie descrita para San Martín y Huánuco. Estas dos especies compartían similitudes a nivel de la concha. Sin embargo, a nivel de sistema reproductor las diferencias son evidentes en el patrón de bandas de la superficie interna del pene (Borda y Ramírez, 2013).

Además, mucho del territorio peruano aún se encuentra inexplorado por lo que existen algunas especies de *Megalobulimus* por describir y con ello determinar las relaciones evolutivas dentro del género. Tal es el caso de las poblaciones de *Megalobulimus* presentes en el departamento de Huancavelica y que forman parte de la colección malacológica de MUSM (Ramírez com. per).

De lo expuesto podemos delinear dos principales problemas. Primero, un problema a nivel intraespecífico en el género *Megalobulimus*, ¿Las subespecies de *M. leucostoma* conforman una unidad como especie o son unidades independientes? Y un segundo problema a nivel interespecífico, ¿Cuáles son las relaciones de parentesco entre las especies de *Megalobulimus*? El presente trabajo de tesis tiene por objetivo caracterizar algunas especies de *Megalobulimus* presentes en el sur de la vertiente oriental de los Andes peruanos y establecer sus relaciones de parentesco con respecto a las demás especies del género. Para la resolución de estos problemas se realizaron tanto análisis morfológicos como análisis moleculares.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Vertiente oriental de los Andes

Los Andes tropicales conforman la región biogeográfica con la mayor diversidad biológica en el mundo (Myers *et al.*, 2000), siendo la vertiente oriental la que acumula mayor riqueza de especies (Swenson *et al.*, 2012), debido a las masas de aire húmedo procedentes de la Amazonía y la topografía, las cuales interactúan para moldear la diversidad de la cordillera de los Andes (Killeen *et al.*, 2007).

Existe evidencia de que los ensamblajes de especies en los Andes han sido influenciados por la heterogeneidad fisiográfica y que distintos biomas han evolucionado en un aislamiento relativo, a pesar de su proximidad física (Särkinen *et al.*, 2012). La confluencia de estos factores ha convertido a los Andes en una importante fuente de endemismos los cuales se han reportado para diferentes taxa (Lamas, 1982; García-Moreno y Fjeldså, 2000; Moritz *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2008; Solomon *et al.*, 2008; Swenson *et al.*, 2012).

Uno de los principales modelos de estudio en los Andes han sido las aves, en las cuales se han evaluado la influencia de eventos geológicos y ecológicos a nivel de especie e intraespecífico (Brumfield y Edwards, 2007; Cadena, 2007; Parra *et al.*, 2009). Por ejemplo, Quiñonez (2010) realizó una evaluación de las relaciones filogenéticas a nivel intraespecífico de dos especies de colibríes del género *Coeligena* y con lo que logró identificar algunos de los procesos que pudieron influenciar la diferenciación de sus poblaciones. Determinó que el terreno fragmentado de los Andes, en especial el valle seco del Marañón, es una de las principales barreras para el flujo génico de estas especies.

De Thoisy *et al.* (2010) emplearon a *Tapirus terrestris*, un mamífero herbívoro de amplia distribución en Sudamérica, para responder algunas preguntas sobre los mecanismos que moldearon la estructuración de sus poblaciones actuales.



Concluyeron que los eventos climáticos del pleistoceno, especiación parapátrica y la influencia del río Amazonas fueron las principales fuerzas que actuaron en la diversificación de las poblaciones de esta especie.

Romero (2010) utilizó al molusco terrestre *Systrophia helycicloides* (d'Orbigny) como modelo de estudio para determinar si existía relación entre la estructuración genética poblacional de esta especie con los cambios dinámicos que ocurren en el bosque tropical lluvioso en el departamento de Madre de Dios. Para esto hizo uso de dos marcadores mitocondriales, Citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y la subunidad 16S del RNA ribosomal (16S rRNA). Romero no encontró estructuración en sus poblaciones actuales, concluyendo que la orogénesis pudo provocar una diferenciación inicial pero que la dinámica de los ríos se encargó de mantener el flujo entre las poblaciones.

Ramírez *et al* (2012) resaltaron la presencia de numerosos endemismos para dos familias de moluscos terrestres (Scolodontidae y Strophocheilidae) en los bosques tropicales de los Andes. Indicaron, además, que la distribución de especies endémicas como *Systrophia eatoni* (Baker) y *Megalobulimus maximus* coinciden con la distribución de mariposas endémicas dentro de la unidad biogeográfica Inambari propuesta por Lamas (1982).

Hasta aquí se puede dar cuenta de la influencia de la alopatría de las poblaciones como uno de los principales motores de la diversificación de especies, dicha alopatría se presenta por la topografía accidentada de los Andes provocando así la separación y posterior diversificación de las poblaciones.

## **2.2. Los moluscos como modelo de estudio**

El clado mollusca, particularmente los moluscos terrestres presentan diversas características que permiten emplearlos como modelo de estudio. El hermafroditismo

está presente en la gran mayoría de especies de moluscos terrestres (Gómez, 2001) y permite testar diferentes hipótesis relacionadas a selección sexual (Beese *et al.*, 2006). La escasa vagilidad de estas especies permite que mucho del registro histórico de su hábitat quede plasmado en su patrón de diversidad genética (Hugall *et al.*, 2002). Esto los hace buenos candidatos para filogeografía y biogeografía histórica.

Wade *et al.* (2006) evaluaron las relaciones evolutivas de 160 especies de moluscos terrestres del Suborden Stylommatophora en base a un marcador nuclear. La filogenia molecular resultó tener dos grupos monofiléticos que denominaron el “achatinoideo” y el “no achatinoideo”. Dentro de este estudio se incluyó a *Megalobulimus oblongus*, la que quedó incluida dentro del clado de los “no achatinoideos” y en posición basal. *Megalobulimus oblongus* se agrupó con *Corilla adamsi* (Familia Corilidae), aunque no presentó buen soporte. Ramírez *et al.* (2012) evaluaron la misma hipótesis, la relación entre diferentes clados de moluscos terrestres, pero incluyendo nuevos taxa. Sus resultados soportaron la ubicación del género *Megalobulimus* dentro del clado “no achatinoideo”. Además, se demostró la existencia de más de dos clados para el Suborden Stylommatophora al ubicar a la Familia Scolodontidae en un nivel basal independiente a los dos clados descritos por Wade *et al.* (2001; 2006) (Ramírez *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2012).

Los primeros estudios moleculares en moluscos terrestres del Perú fueron abordados por Ramírez (2004) y se enfocaron en la sistemática y filogeografía de las especies de moluscos de las lomas de la costa peruana. El empleo de marcadores mitocondriales dentro de este estudio permitió esclarecer las relaciones evolutivas dentro de las especies de la costa peruana, por lo que han sido considerados en posteriores estudios como el desarrollado por Romero (2008), Ramirez (2009) y Chumbe (2009) en la costa peruana.

Los primeros estudios moleculares en especies amazónicas de moluscos terrestres, además del desarrollado por Romero (2010), son los de Congrains (2010) y Chirinos (2012). Congrains empleó los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA

para realizar la primera caracterización a nivel molecular de las especies de *Megalobulimus* distribuidas en el departamento de San Martín y en donde resalta que la presión antrópica (extracción indiscriminada y destrucción del hábitat) podría ser la principal causante de la baja diversidad genética que reportó para dichas especies. En tanto que Chirinos buscó determinar el grado de diversidad genética y estructuración poblacional en *Megalobulimus huascari* (Tschudi, 1852), una especie endémica que se distribuye en la selva central del Perú. A partir del marcador mitocondrial 16S rRNA, Chirinos describió una alta diversidad haplotípica y ausencia de estructuración, esta alta diversidad la atribuyó a eventos tales como la orogenia de los Andes. En base a estos estudios se tiene una ligera visión del contraste que existe entre los patrones de diversidad genética que presentan estas especies.

Borda y Ramirez (2013) reportaron la presencia de una nueva especie de *Megalobulimus* en el valle del Urubamba en la provincia de La Convención, en el departamento de Cusco. Las poblaciones de esta especie fueron descritas originalmente como *Megalobulimus capillaceus* (Pfeiffer, 1855), la cual se encuentra distribuida en los dptos. de San Martín y Huánuco y que solo había sido descrita a nivel de la concha. Las diferencias a nivel de concha y anatomía interna permitieron la correcta discriminación de esta especie la cual fue designada como *M. florezi*. Este caso demuestra que las descripciones basadas únicamente en la concha de los moluscos no son suficientes para discriminarlas por lo que es necesario abordar estudios de anatomía interna y de biología molecular.

### **2.3. La Familia Strophocheilidae en el Perú**

El género *Megalobulimus* agrupa a las especies de caracoles terrestres de mayor tamaño en el Neotrópico, presentan un gran interés científico y económico: Científico por ser especies de amplia distribución en la cuenca amazónica que podrían servir como modelos para estudios sobre endemismos y procesos que dieron origen a la biodiversidad en la Amazonía, y, económico por ser una importante fuente de

proteínas en la dieta de los pobladores nativos de la cuenca amazónica (Ramírez y Cáceres, 1991).

El conocimiento que se tiene acerca de las especies de este género está dado en dos campos como anatomía y biología molecular, pero no se ha desarrollado en todas las especies por lo que solo se tiene información concreta de un número reducido. Los primeros estudios realizados en estas especies fueron a nivel anatómico por Semper y Simroth (1894) para *Megalobulimus maximus* enfocado a la descripción general de la anatomía interna, concha y rádula de esta especie. En el siglo siguiente fueron Baker (1926) y Hylton – Scott (1939) quienes aportaron grandemente con las descripciones morfológicas de las especies de *M. oblongus* (Müller, 1774) de Venezuela y *M. lorentzianus* (Döring, 1876) del norte de Argentina, respectivamente. En 1948, Bequaert realizó una descripción a nivel de concha para todas las especies de la Familia Strophocheilidae, familia en la cual se encontraba inmersa *Megalobulimus* con un estatus de subgénero. Esta descripción de Bequaert fue acompañada de un levantamiento de todos los datos de distribución disponibles en museos del mundo. Posteriormente, en base a un análisis de la parte blanda (genitalia, complejo paleal y sistema digestivo) de diferentes especies de la Superfamilia Strophocheiloidea, Leme (1973) eleva a *Megalobulimus* al estatus taxonómico de género y además los posiciona en una familia independiente, la Familia Megalobulimidae, pero a partir del 2005 es considerada como Subfamilia Megalobuliminae según la clasificación de gasterópodos de Bouchet y Rocroi (2005).

Ramírez *et al.* (2003) destacaron la presencia de nueve especies para este género en el Perú distribuidas en las zonas boscosas de la vertiente oriental de los Andes, de las cuales solo se tiene un estudio anatómico completo para tres de ellas, *M. capillaceus*, *M. florezi* y *M. separabilis* (Borda y Ramírez, 2013). Cada una de las especies de esta subfamilia presenta una larga lista de sinonimias, entre las cuales resalta el caso de *Megalobulimus leucostoma*. Esta especie presenta tres subespecies discriminadas por las características de su concha: *M. leucostoma leucostoma*, *M. leucostoma weyrauchi* y *M. leucostoma lacunosus*. Estas subespecies fueron descritas

por diferentes autores. Las dos primeras han sido descritas para el valle de Urubamba en la provincia de La Convención en Cusco. En la revisión de sinonimias, para el caso del *M. leucostoma leucostoma*, son seis los diferentes epítetos específicos otorgados a esta subespecie, entre los que tenemos a *Helix mathiusii* (d'Orbigny, 1835), *Bulinus mahogani* (Sowerby, 1838), *Bulimus castelnaudi* (Hupé, 1857), *Bulimus hupeanus* (Morelet, 1863) y *Bulimus dürfeldti* (Dohrn, 1863). El punto en común entre estas entidades es su presencia en la región norte del departamento de Cusco y con la duda de si corresponden a entidades diferentes o variabilidad intraespecífica. En el caso de *M. leucostoma lacunosus*, ha sido sinonimizada con *M. santacruzii* (Pfeiffer, 1868), una especie con la cual comparte muchas similitudes y reportada para Perú (departamento de Puno) y Bolivia. Las descripciones de estas subespecies, basadas en concha, no presentan datos claros que ayuden a la correcta diferenciación de ellas, salvo por la distribución para el caso del *M. leucostoma lacunosus*, o en el caso de las especies del valle del Urubamba, la diagnosis no es suficiente para diferenciarlas por lo que la situación taxonómica de este complejo permanece incierta.

Desde el punto de vista económico, *Megalobulimus* ha sido considerado una fuente de proteínas y forma parte de la dieta de los pobladores de la amazonia (Rámirez y Cáceres, 1991). Flórez (1970) resaltó la importancia alimenticia que tiene el género *Megalobulimus* para los pobladores del valle del Kosñipata en la provincia de Paucartambo, además mencionó que estas especies son conocidas por dos nombres vulgares que las engloban, “chu’ru” y “congompe”. Este último nombre no está restringido a esta provincia, sino que es ampliamente utilizado en toda la amazonia peruana (Dourojeanni, 1965; Ramírez y Cáceres, 1991; Borda *et al.*, 2010). A pesar de su uso alimenticio, los aspectos biológicos así como los criterios de crianza son escasos (Campoverde, 1992). Aunque cabe resaltar el estudio de Rengifo (2003), quien desarrolló una caracterización morfológica y estableció medidas de crianza para *Megalobulimus maximus*, demostrando su facilidad de cultivo en un área tropical.

Entonces, es claro que existe un panorama confuso frente a la validez de cada uno de los nombres, considerando que la concha es un carácter muy plástico y a veces poco informativo. La presencia de cuatro de las nueve especies reportadas para Perú

en un solo departamento, además de la importancia económica de estas especies, resalta la necesidad de estudiar a estas especies.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:**

#### **3.1. HIPÓTESIS:**

La variación a nivel morfológico es coincidente con la variación molecular en la discriminación de los taxa de *Megalobulimus* del sur de los Andes del Perú.

#### **3.2. OBJETIVOS:**

##### **3.2.1. Objetivo general:**

- Evaluar los patrones de polimorfismo morfológico y molecular de *Megalobulimus* (Mollusca, Gastropoda) en el sur de los Andes del Perú y sus relaciones evolutivas con las especies del género presentes en Perú.

##### **3.2.2. Objetivos específicos:**

- Estimar el grado de variabilidad morfológica (concha y genitalia) de las poblaciones de las especies presentes en el área de estudio.
- Discriminar los taxa del género *Megalobulimus* presentes en el área de estudio, en base a características de la concha y el sistema reproductor.
- Evaluar la diversidad genética de las especies presentes en el área de estudio, en base a los marcadores mitocondriales 16S rRNA y COI.
- Inferir las relaciones evolutivas de las especies de *Megalobulimus* de la vertiente oriental de los Andes peruanos, en el árbol filogenético de las especies presentes en Perú, basados en el marcador mitocondrial 16S rRNA.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

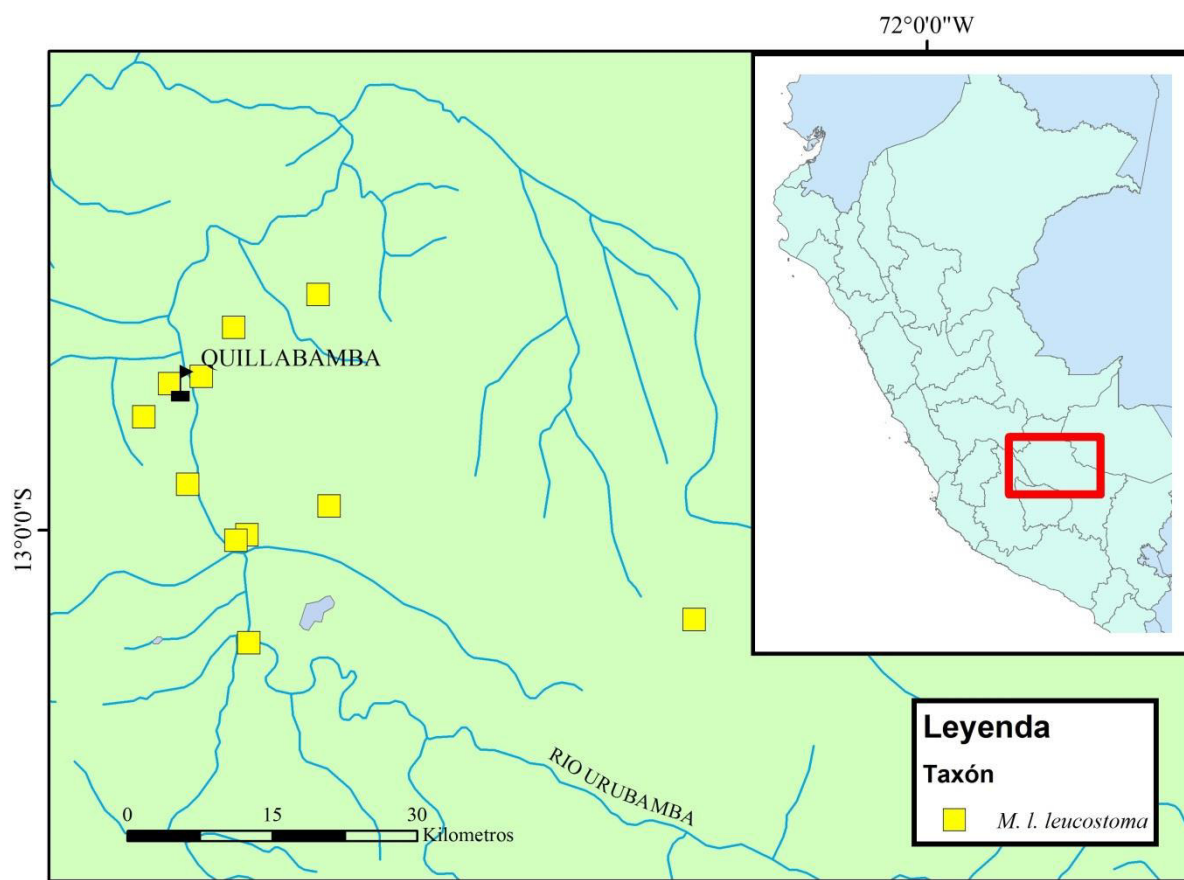
### 4.1. Muestreo:

Las colectas se llevaron a cabo durante los meses febrero, marzo y junio del 2012 en las provincias de La Convención, Urubamba y Calca, pertenecientes al departamento de Cusco, y en la provincia de Carabaya en el departamento de Puno, y durante el mes de febrero del 2014 en la provincia de Tayacaja en Huancavelica. Entre las localidades evaluadas están las mencionadas por Bequaert (1948), excepto Huancavelica; se visitaron las zonas boscosas como las zonas de cultivo. El método de colecta fue búsqueda directa.

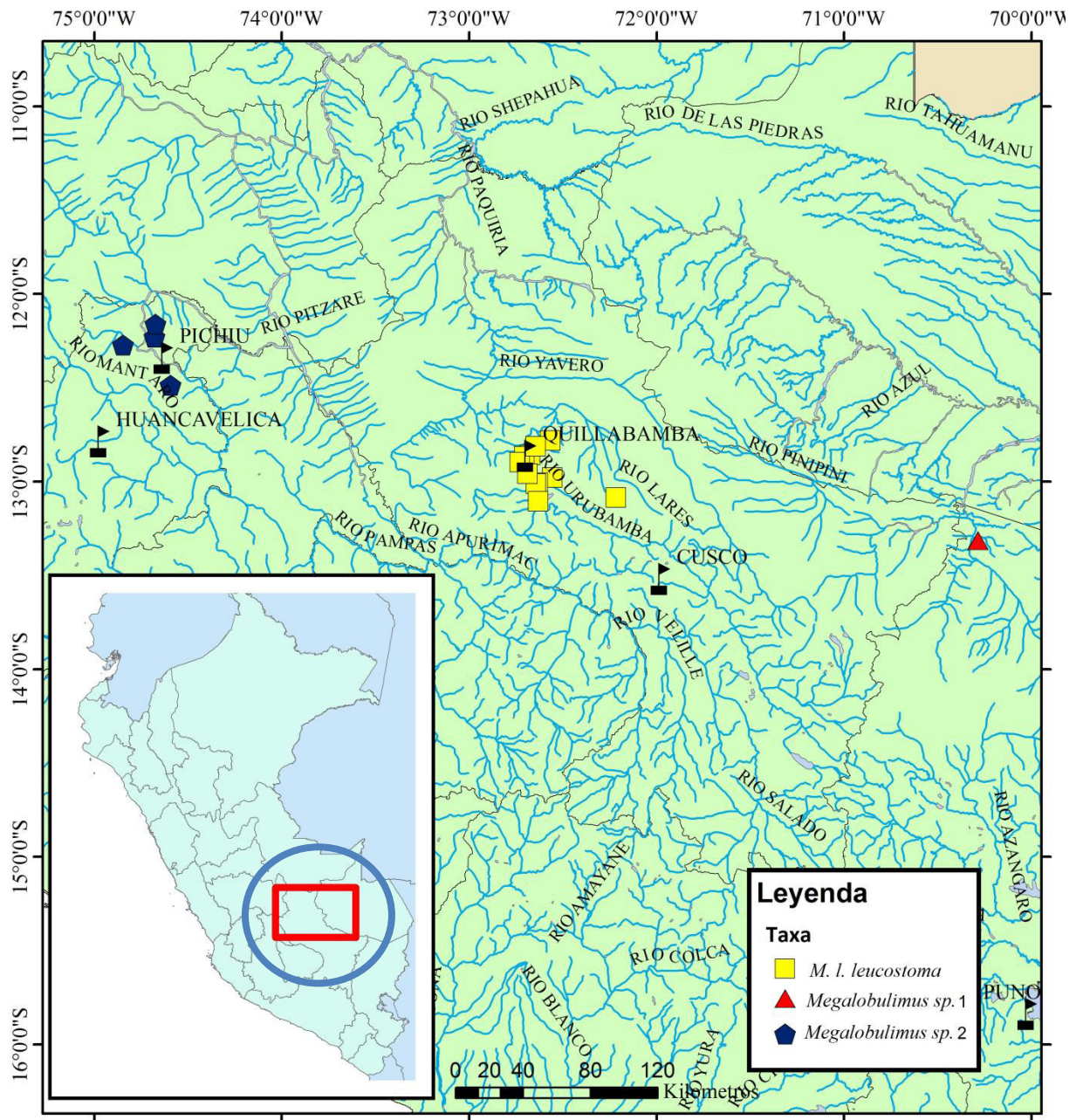
Para Cusco se obtuvieron 40 individuos con parte blanda de *M. leucostoma* procedentes de 9 localidades diferentes, 25 individuos de *M. florezi* procedentes de 5 localidades diferentes, ambas especies dentro de la provincia de La Convención. En total se colectaron en 11 localidades diferentes (Tabla 1). Esta provincia corresponde a la zona de vida Bosque Húmedo tropical (bh-t) según el sistema de Holdridge (Holdridge, 1947) (Figura 1). Las localidades más distantes fueron Huyro y Echarate las cuales están separadas por 26 Km. Todas las localidades se encuentran próximas al río Vilcanota, cuatro de ellas a la margen izquierda (Sambaray, Potrero, Uchumayo y Echarate2) y siete a la margen derecha (Pavayoc, Huyro, Echarate1, Quillabamba, Santa María, Chaullay, Huayanay). El punto de colecta a mayor altitud fue en Huyro (1851 msnm), la cual también corresponde a la localidad más al sur dentro del departamento de Cusco. Asimismo, la localidad a menor altitud fue Sambaray (1077 msnm). En el caso de Puno, en la provincia de Carabaya, se obtuvieron dos individuos cuyas características de la concha guardan similitud con *M. l. lacunosus*. *Megalobulimus leucostoma lacunosus* fue descrita para esta localidad, sin embargo, a los individuos colectados se les denominará *Megalobulimus* sp. 1 con la intención de comprobar su identidad (Figura 3). Esta localidad corresponde al Bosque húmedo tropical (bh-t) (Tabla 2 y Figuras 4 y 5). Finalmente, para Huancavelica, se colectaron 13 individuos de *Megalobulimus* sp. 2 en la provincia de Tayacaja en tres distritos



diferentes: Colcabamba, Surcubamba y Pichiu. Estas localidades se encuentran dentro de la zona de vida Bosque húmedo Montano tropical (bh-MT). Los especímenes colectados fueron sacrificados por ahogamiento, preservados en alcohol 96° y almacenados en la colección malacológica del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (MUSM).

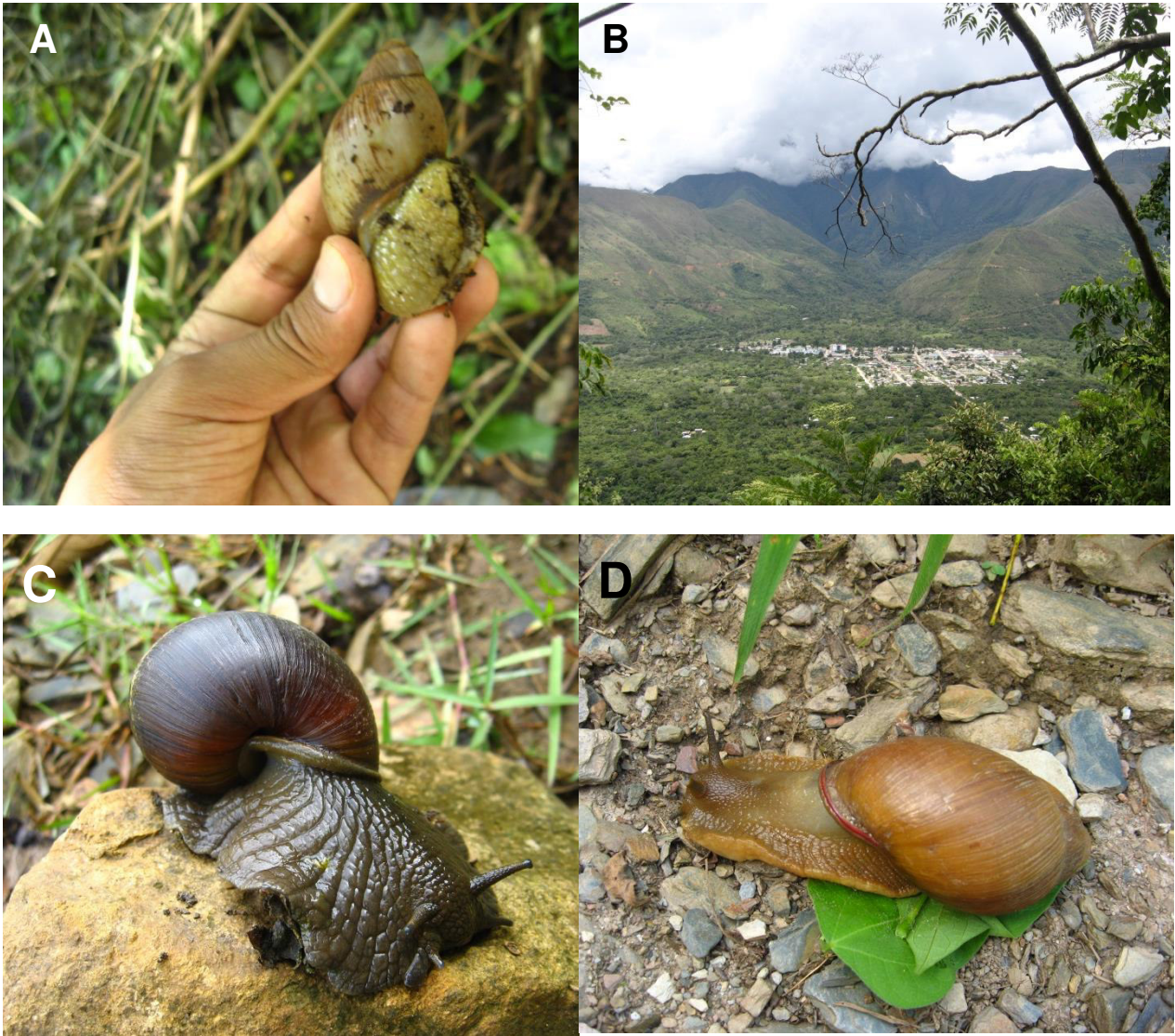


**Figura 1.** Lugares de colecta de *Megalobulimus leucostoma leucostoma*, en la provincia de La Convención en el departamento del Cusco. Los ríos están diferenciados como líneas en azul.



**Figura 2.** Mapa de procedencia del material evaluado (Suroriente del Perú) para *M. leucostoma leucostoma*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2. Se observan los departamentos de Cusco, Puno y Huancavelica. Los ríos están diferenciados como líneas en azul.





**Figura 3.** Especímenes colectados en la provincia de La Convención en el Dpto de Cusco (A) *Megalobulimus leucostoma* colectado en el distrito de Santa Ana. (B) Vista panorámica del poblado de Echarate. (C) *M. leucostoma* levógiro colectado en la localidad de Huayanay. (D) *M. florezi* colectado en la localidad de Pavayoc.

**Tabla 1.** Procedencia de los especímenes colectados en el presente estudio

Departamento	Provincia	Localidad	Coordenadas	Altura (msnm)	Especie	# de individuos
Cusco	La Convención	Pavayoc	S:12°51'39.52" W: 72°41'13.9"	1080	<i>M. leucostoma</i>	7
	La Convención	Huyro	S: 12°58'39.5" W: 72°33'21.9"	1851	<i>M. leucostoma</i>	10
	La Convención	Santa María	S: 13°00'16.2" W: 72°37'57.1"	1215	<i>M. leucostoma</i>	1
	La Convención	Chaulay	S: 13°00'34.6" W: 72°38'34.9"	1250	<i>M. leucostoma</i>	2
	La Convención	Sambaray	S:12°51'49.50" W: 72°42'16.2"	1077	<i>M. leucostoma</i>	12
	La Convención	Echarate1	S: 12°46'51.0" W: 72°33'59.7"	1158	<i>M. leucostoma</i>	2
	La Convención	Potrero	S: 12°53'41.0" W: 72°43'42.6"	1561	<i>M. leucostoma</i>	1
	La Convención	Uchumayo	S: 12°57'26.0" W: 72°40'25.8"	1169	<i>M. leucostoma</i>	4
	La Convención	Huayanay	S: 12°48'40.3" W: 72°38'42.6"	1736	<i>M. leucostoma</i>	1
	La Convención	Quillabamba1	S: 12°52'42.2" W: 72°41'41.4"	1094	<i>M. florezi</i>	6
	La Convención	Quillabamba2	S: 12°53'09.8" W: 72°41'27.5"	1179	<i>M. florezi</i>	3
	La Convención	Quillabamba3	S: 12°52'26.3" W: 72°42'07.3"	1138	<i>M. florezi</i>	7
	La Convención	Pavayoc	S:12°51'39.52" W: 72°41'13.9"	1080	<i>M. florezi</i>	2
	La Convención	Santa María	S: 13°00'16.2" W: 72°37'57.1"	1215	<i>M. florezi</i>	1
	La Convención	Echarate1	S: 12°46'51.0" W: 72°33'59.7"	1073	<i>M. florezi</i>	5
	La Convención	Echarate2	S: 12°46'11.4" W: 72°32'21.7"	1158	<i>M. florezi</i>	1
	La Convención	Sambaray	S:12°51'49.50" W: 72°42'16.2"	1077	<i>M. florezi</i>	1
	Calca	Lares	S: 13°05' W:72°13'	-	<i>M. leucostoma</i>	2
Puno	Carabaya	Chacaneque	S:13°18'53" W:70°17'08"	2356	<i>Megalobulimus</i> sp. 1	2
Huancavelica	Tayacaja	San Lorenzo	S:12°29'11" W:74°35'36"	2491	<i>Megalobulimus</i> sp. 2	6
		Jatuspata	S:12°13'45" W:74°40'44"	2690		5
		Pichiu	S:12°16'19" W:74°50'48"	3095		2

## 4.2. Revisión de colecciones científicas:

Se realizó una revisión de las principales colecciones científicas del Perú y el extranjero para la evaluación del material tipo, lo cual es clave para la determinación del estatus taxonómico. La revisión de dicho material custodiado en museos del extranjero se llevó a cabo mediante imágenes digitales de las conchas las cuales fueron proveídas por los respectivos curadores de cada colección científica.

Los museos cuyo material fue revisado y los curadores respectivos son:

- Museo de Historia Natural de UNMSM (**MUSM**) – Rina Ramírez.
- Florida Museum of Natural History (**FLMNH**) – John Slapcinsky.
- Field Museum of Natural History (**FMNH**) – Jochen Gerber
- Natural History Museum of the United Kingdom (**NHMUK**) – Jon Ablet
- Museum of Comparative Zoology (**MCZ**) – Adam Baldinger

## 4.3. Discriminación morfológica:

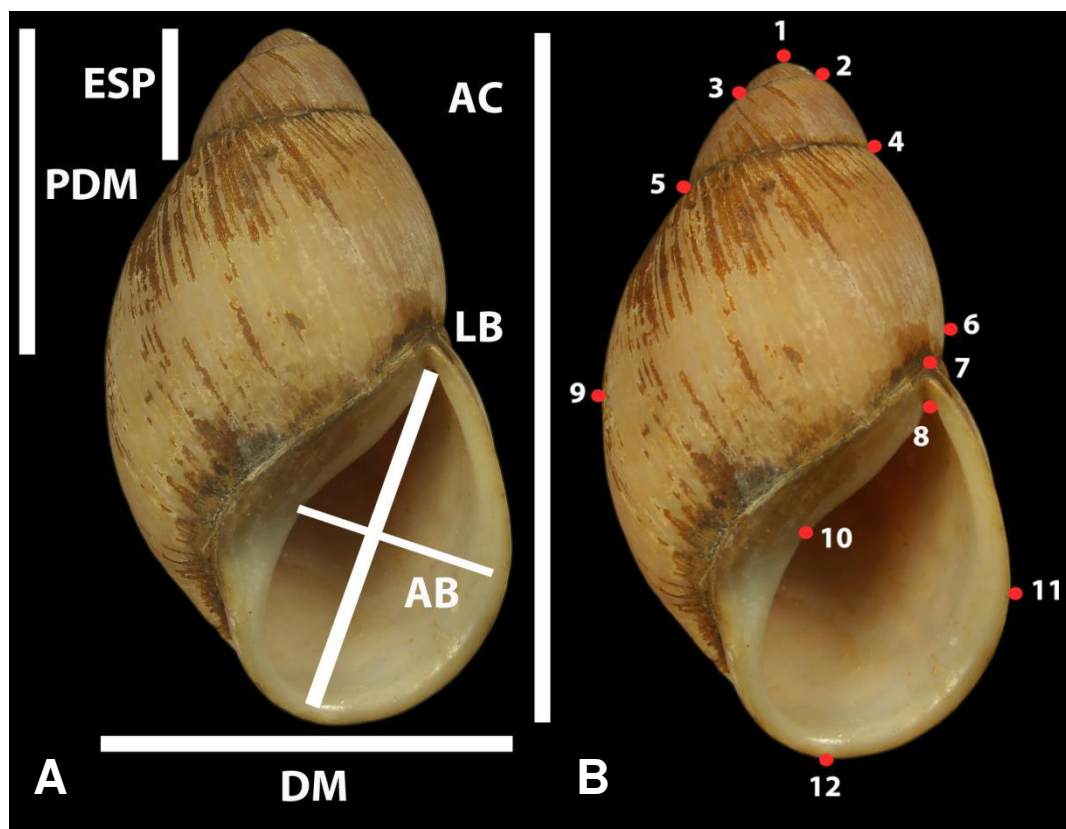
### 4.3.1.1. Análisis morfométrico:

Con la finalidad de realizar una primera discriminación de las especies se realizó un análisis exploratorio multivariado de las especies de *Megalobulimus* provenientes de los Andes del sur del Perú, tanto del material de colección como material colectado.

Para la morfometría clásica, se emplearon seis variables de distancia continuas obtenidas a través de imágenes digitales de la concha de los especímenes en el programa NIH IMAGE *public domain* (versión 1.63, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Las variables consideradas fueron: altura de la concha (**AC**), diámetro mayor de la concha (**DM**), largo de la abertura (**LB**), ancho de la abertura (**AB**), espira (**ESP**) y posición del diámetro mayor (**PDM**) (Figura 1A). Las medidas obtenidas fueron logaritmizadas y luego sometidas al análisis de componentes principales (ACP) mediante el programa SPSS ver 17.

Para la morfometría geométrica se consideraron 12 *landmarks*, los cuales fueron digitalizados con el programa TpsDig versión 2.16 (Rohlf, 2010) (Figura 1B), considerados en base al trabajo de Schilthuisen y Haase (2010). Las coordenadas fueron ingresadas al programa MorphoJ 1.05 (Klingenberg, 2011), realizándose un alineamiento de las coordenadas iniciales usando el método generalizado ortogonal de Procrustes (Rohlf y Slice, 1990), que determina una configuración de referencia al minimizar la suma del cuadrado de las distancias entre *landmarks* homólogos de diferentes especímenes (Carvajal-Rodríguez *et al.*, 2005).

Luego del alineamiento se generó una matriz de covarianza, la que permitió realizar el análisis de componentes principales. Se consideraron las tres primeras componentes principales para realizar un MANOVA no paramétrico, esto debido al número desbalanceado de individuos de cada subespecie. El MANOVA se realizó con el objetivo de comparar las medias multivariadas para los taxa en estudio, se consideraron los índices de distancia Euclidiano y de Mahalanobis. Finalmente se realizó un análisis discriminante para mejorar la distinción entre los grupos evaluados a partir de las tres primeras componentes principales donde ya se vería reflejada la variación original de los *landmarks*. Estos análisis fueron desarrollados en el programa PAST ver 3.0 (Hammer *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Variables de la concha consideradas para el análisis morfométrico. (A) AC: Altura de la concha. DM: Diámetro mayor de la concha DL: Diámetro lateral. LB: Largo de la abertura. AB: Ancho de la abertura. ESP: Espira. PDM: Posición del diámetro mayor. (B) *Landmarks* utilizados en el estudio basados en Schilthuizen & Haase (2010). Individuos procedentes de Pavayoc, Provincia de la Convención, Cusco.

#### 4.3.1.2. Análisis morfológico:

##### La concha:

Se describieron las principales características de la concha de los especímenes, entre éstas, las características de la protoconcha, superficie de la concha, la disposición de las suturas y la variabilidad intraespecífica. La terminología empleada se basó en Burch (1962).

## La genitalia:

La parte blanda de los especímenes fue disectada siguiendo la metodología de Beaumont y Cassier (1970) para disecciones de gasterópodos y la terminología empleada según Leme (1973). La genitalia fue extraída para la caracterización de la superficie externa e interna de los principales órganos de importancia taxonómica para el género (pene, epífalo, vagina y oviducto libre), además de una caracterización de la variabilidad poblacional de *M. leucostoma*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2. Dentro de los gráficos de la genitalia se consideraron las siguientes abreviaciones:

### Abreviaciones de la genitalia:

<b>Ace:</b>	Abertura de conducto de la bursa espermatolítica
<b>Bes:</b>	Bursa espermatolítica
<b>Cbe:</b>	Conducto de la bursa espermatolítica
<b>Cdf:</b>	Conducto deferente
<b>Che:</b>	Conducto hermafrodita
<b>Dio:</b>	Divertículo interno del oviducto libre
<b>Dol:</b>	Divertículo del oviducto libre
<b>Esp:</b>	Espermioviducto
<b>Epi:</b>	Epífalo
<b>Gal:</b>	Glándula de la albúmina
<b>Gon:</b>	Gónada
<b>Gpr:</b>	Glándula prostática
<b>Mrp:</b>	Músculo retractor del pene
<b>Ovl:</b>	Oviducto libre
<b>Pen:</b>	Pene
<b>Pli:</b>	Pliegues del pene
<b>Plm:</b>	Pliegue mayor del pene
<b>Plt:</b>	Pliegues transversales
<b>Pov:</b>	Pliegues del oviducto libre
<b>Pvg:</b>	Pliegues de la vagina
<b>Sga:</b>	Saco glandular anexo
<b>Vag:</b>	Vagina



#### 4.4. Análisis Molecular:

##### 4.4.1. Extracción, Amplificación y secuenciamiento de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 1 mm<sup>3</sup> de tejido muscular de pie con el kit de extracción *Mollusc* DNA de Omega Bio-Tek, el cual es específico para muestras con alto contenido de mucopolisacaridos, como son los moluscos, los cuales inhiben a la polimerasa durante la amplificación (Doyle y Doyle, 1987). Este *kit* hace uso del detergente cetiltrimetil bromuro de amonio (CTAB por sus siglas en ingles) en conjunción con una matriz de unión al DNA. Además, se emplea cloroformo para remover los mucopolisacáridos seguido de una rápida precipitación con alcohol etílico, para luego continuar con diluciones que garanticen la remoción de proteínas y otros contaminantes. Por muestra extraída se obtuvieron dos eluciones las cuales fueron refrigeradas a -20°C. Para la amplificación del DNA extraído se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) utilizando los *primers* para el marcador mitocondrial 16S rRNA diseñados para moluscos por Ramírez (2004):

16SF-104 (5'-GACTGTGCTAAGGTAGCATAAT-3')

16SR-472 (5'-TCGTAGTCCAACATCGAGGTCA-3')

Y los *primers* diseñados por Folmer *et al.* (1994) para el gen de la citocromo c oxidasa subunidad I (COI):

LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')

Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 12,5µL la cual contiene: 0,1µL de *Taq* DNA polimerasa a 5u/µL, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, 1,25 µL dNTP a 2 mM, 1,25 µL de cada *primer* a 2 µM y 2 µL de DNA extraído.

Para la amplificación del marcador 16S RNA, los ciclos fueron: Denaturación inicial a 96°C por 60 segundos; a continuación 40 ciclos: Denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación de los *primers* a 48°C por 30 segundos, y extensión a 72°C durante 60 segundos, por 40 ciclos. Como control de la amplificación se empleó 2 µl de agua bidestilada en vez del DNA, manteniendo tal cual los demás componentes.

Para la amplificación del marcador citocromo oxidasa I los ciclos fueron: Denaturación inicial de 96°C por 1 minuto, a continuación 35 ciclos: Denaturación a 95°C por 60 segundos, hibridación de los iniciadores a 40°C por 60 segundos y extensión a 72°C durante 90 segundos, terminando con una paso de extensión final a 72°C por 7 minutos. La temperatura de hibridación fue aumentada en las muestras que presentaron más de una banda.

La visualización del DNA amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% diluida en tampón de corrida (TBE) junto con 2,5 µl de SYBR Green; para esto se empleó 4,5 µl de muestra amplificada y 1µl de Azul de bromofenol. La observación de las bandas se realizó en un transiluminador Safe Imager 2.0 Blue Light de la empresa Invitrogen. Aquellos productos de PCR que resultaron positivos fueron enviados a la compañía MACROGEN en Corea ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) donde se realizó la purificación del amplificado mediante el uso de perlas magnéticas. Las reacciones de secuenciamiento fueron realizadas en un secuenciador automático ABI 3730xl, previa purificación con perlas magnéticas. Ambas hebras fueron secuenciadas con los mismos *primers* utilizados en la PCR.

#### **4.4.2. Edición y alineamiento múltiple de las secuencias:**

Las secuencias de ambas hebras de los productos de PCR de los marcadores mitocondriales 16S rRNA y COI fueron sometidas a edición manual en el programa Chromas (McCarthy, 1996) y la secuencia consenso se obtuvo mediante CAP3 (Huang y Madan, 1999). El alineamiento múltiple de las secuencias en formato fasta fue

llevado a cabo a través del programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004).

#### 4.4.3. Caracterización de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) (Benson *et al.*, 2013) a través de la herramienta BLASTn del NCBI (National Center for Biotechnology Information), esto permitió verificar si la secuencia de ADN obtenida corresponde realmente a los genes a evaluar.

Se estimó la composición de nucleótidos de las secuencias y la distancia genética, calculada en base al número promedio de sustituciones por sitio por cada par de secuencias, mediante el programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) para las secuencias alineadas y empleando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura dos parámetros.

Para la evaluación de la saturación mutacional se realizó una gráfica de número de transiciones y transversiones a partir de pares de secuencias por medio del software DAMBE (Xia, 2013) para las secuencias alineadas y empleando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura dos parámetros.

#### 4.4.4. Diversidad Genética

Las secuencias en formato fasta fueron evaluadas para determinar el número de haplotipos presentes en cada especie de *Megalobulimus* del área de estudio mediante el programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009). Los valores de diversidad genética (H) y nucleotídica (Pi) se obtuvieron mediante el software DNAsp. La diversidad genética o haplotípica (h) es la probabilidad de tomar dos haplotipos idénticos en una muestra (Nei, 1987) (Ecuación 1).

$$h = \frac{n}{n-1} (1 - \sum_{i=1}^k p_i^2) \quad (1)$$

Donde:

**k**: número de haplotipos diferentes

**p<sub>i</sub>**: frecuencias para cada i haplotipo

**n**: número de secuencias de DNA evaluadas

La diversidad nucleotídica,  $\pi$  ( $\pi$ ), es el promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre un par de secuencias (Nei, 1987) (Ecuación 2).

$$\pi = 2 \sum_{i < j} \frac{\widehat{d}_{ij}}{[n(n-1)]} \quad (2)$$

Donde:

**d<sub>ij</sub>**: estimado del número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre las secuencias i y j

**n**: número de secuencias de DNA evaluadas.

#### 4.4.5. Redes de haplotipos

Las redes de haplotipos o *networks* consisten en filogenias intraespecíficas que se grafican en forma de una red de las relaciones evolutivas dentro de los miembros de una población. Este análisis fue realizado con el programa NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999). Mediante el programa DNAsp, los archivos de haplotipos de los marcadores 16S rRNA y COI para cada especie de *Megalobulimus* evaluada fueron convertidos a archivos de extensión “.rdf” los cuales pueden ser manejados en el programa Network. Para la obtención de la red de haplotipos se empleó el algoritmo “median joining”. Este algoritmo se caracteriza por incluir dentro de la red nuevos vértices denominados “median vectors” que representan los haplotipos no muestreados o extintos. Estos vértices permiten una mejor visualización de las relaciones intraespecíficas, además este algoritmo permite trabajar con caracteres multiestado así como con conjuntos de datos grandes.

#### 4.4.6. Patrones demográficos

El análisis de la demografía a nivel molecular implica la determinación de episodios de crecimiento o declive de la población a partir de comparación de las diferencias de las secuencias entre pares de individuos. Para evaluar si existió una expansión demográfica súbita en las poblaciones de *Megalobulimus* se calculó la distribución de diferencias a pares de las secuencias (*mismatch distribution*) (Rogers y Harpending, 1992) en el programa DNAsp. Este programa grafica esta distribución la cual fue calculada en base a la ecuación 3 propuesta por Watterson (1975).

$$\hat{F}_t \approx \frac{\theta^i}{(\theta+1)^{i+1}} = \hat{F}_0(1 - \hat{F}_0)^i \quad (3)$$

Donde:

**Fi (t):** probabilidad de que dos genes neutrales difieran exactamente en i nucleótidos para una generación t

**$\theta = 2Nu$**  : número esperado de diferencias a pares

**N:** Número de individuos

**u:** tasa de mutación

Para probar si las secuencias presentan un carácter neutral se emplearon dos parámetros estadísticos dentro del programa DNAsp. Estos estadísticos fueron el D de Tajima (Tajima, 1989) y  $F_s$  de Fu (Fu, 1997). La “D” de Tajima está basada en el cálculo de las diferencias entre el número de sitios segregantes y el promedio de mutaciones entre pares de secuencias en la muestra (ecuación 4). Si la diferencia entre estos valores es diferente de 0 entonces se rechaza la hipótesis de evolución neutral para las secuencias:

$$D = \frac{d}{\sqrt{\hat{V}(d)}} = \frac{\hat{k} - \left(\frac{S}{a_1}\right)}{\sqrt{(e_1 S + e_2 S(S-1))}} \quad (4)$$

Donde:

**S**: número de sitios polimórficos

**k**: número promedio de las diferencias a pares entre dos secuencias de DNA

$$a_1: \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$$

$$a_2: \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i^2}$$

$$e_1: \frac{c_1}{a_1}$$

$$e_2: \frac{c_2}{a_1^2 + a_2}$$

**n**: tamaño de la muestra

Además:

- Si **D** > 0, se sugiere que las secuencias han sido afectadas por un reciente evento de cuello de botella o algún tipo de selección balanceadora
- Si **D** < 0, sugiere una reciente expansión poblacional o efecto de selección purificadora.

En el caso de la *F<sub>s</sub>* de *F<sub>u</sub>* se empleó la ecuación 5. Este parámetro estadístico está basado en el modelo de mutación de sitios infinitos. Dicho modelo explica que todo alelo surge una única vez por mutación. La ecuación de *F<sub>u</sub>* calcula la distribución condicional de la frecuencia de haplotipos:

$$F_s = \ln\left(\frac{s'}{(1-s')}\right) \quad (5)$$

Donde:

**S'**: Probabilidad de observar una muestra al azar con un número de alelos igual o menor que el nivel observado de diversidad, considerando que todos los alelos son selectivamente neutros

Además:

- Si  $F_s > 0$ , indica deficiencia de alelos, como se esperaría en un reciente evento de cuello de botella o algún tipo de selección sobredominante.
- Si  $F_s < 0$ , se evidencia un número excesivo de alelos como se esperaría en una reciente expansión poblacional o en arrastre selectivo.

#### **4.4.7. Posición evolutiva de las especies dentro de la subfamilia Megalobuliminae**

Para el establecimiento de las relaciones evolutivas entre las especies en estudio y otras especies de *Megalobulimus*, se empleó el marcador mitocondrial 16S rRNA dado que solo hay disponibilidad de secuencias para este marcador en otras especies del género dentro de la base de datos GenBank (Ramírez *et al.*, 2012; Jaramillo *et al.*, 2014). Se emplearon tres especies de moluscos terrestres como grupos externos (Tabla 1). Todas las secuencias fueron alineadas con MUSCLE y finalmente corregidas a mano.

El modelo de sustitución nucleotídica fue determinado a partir del programa jModeltest 2.1 (Darriba *et al.*, 2012). Este programa permite realizar una selección estadística del mejor modelo que se ajusta al conjunto de datos, para esto emplea tres diferentes estrategias: la prueba de la tasa de verosimilitud o LRT (Likelihood Ratio Test) y los criterios de información de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC). La reconstrucción filogenética se realizó en base a dos metodologías: Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Ambas metodologías se basan en los modelos de sustitución nucleotídica para llegar al árbol más probable pero tienen diferentes estrategias.

El método de Máxima Verosimilitud (ML), en general es un método para estimar parámetros desconocidos de un modelo de probabilidad. El objetivo principal de la inferencia filogenética empleando Máxima Verosimilitud es determinar la topología de un árbol y el tamaño de sus ramas, en base a un modelo de sustitución, que maximice

la probabilidad de observar los datos presentes. Esta búsqueda se realiza mediante métodos heurísticos. El análisis de Máxima Verosimilitud fue realizado en el programa RAxML versión 7.4.2 (Stamatakis *et al.*, 2008) con 1000 replicaciones para el análisis de *bootstrap*.

La Inferencia Bayesiana (IB) emplea el criterio de probabilidad posterior. Calcula la probabilidad condicional de un evento aleatorio A dado un evento B. En filogenética, este método busca los árboles más probables dados los datos de secuencias. Para la búsqueda de estos árboles se emplea el algoritmo MCMC (Cadena de Markov Monte Carlo). Análogo a los métodos heurísticos empleados por Máxima Verosimilitud, MCMC parte de un árbol al azar y modifica los parámetros de manera que calcula la probabilidad del árbol resultante; esto se conoce como una generación. En cada generación, el algoritmo busca generar un árbol con mayor probabilidad al anterior hasta llegar a una fase estacionaria donde los árboles producidos tienen una probabilidad posterior similar al árbol anterior. El análisis de Inferencia Bayesiana fue realizado en el programa MrBayes 3 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) con cuatro Cadenas de Markov Monte Carlo por 2 millones de generaciones, muestreadas cada 1000 generaciones y *burn-in* de 25%.

Los árboles producidos por ML e IB fueron visualizados y editados en el programa FigTree versión 1.4.



**Tabla 2.** Taxa usados en las filogenias moleculares basadas en el marcador mitocondrial 16S rRNA. Las 30 secuencias se encuentran en el GenBank y proceden de Ramírez *et al.* (2012) <sup>(1)</sup>, Jaramillo *et al.* (2014) <sup>(2)</sup>, Rowson *et al.* (2011) <sup>(3)</sup>, Moussalli *et al.* (2009) <sup>(4)</sup>.

Familia	Especie	Nº de accesoión
Strophocheilidae	<i>M. capillaceus</i> <sup>(1)</sup>	JN604725
	<i>M. capillaceus</i> <sup>(1)</sup>	JN604726
	<i>M. capillaceus</i> <sup>(1)</sup>	JN604727
	<i>M. huascari</i> <sup>(1)</sup>	JN604728
	<i>M. huascari</i> <sup>(1)</sup>	JN604729
	<i>M. huascari</i> <sup>(1)</sup>	JN604730
	<i>M. lichtensteini</i> <sup>(1)</sup>	JN604731
	<i>M. lichtensteini</i> <sup>(1)</sup>	JN604732
	<i>M. lichtensteini</i> <sup>(1)</sup>	JN604733
	<i>M. maximus</i> <sup>(1)</sup>	JN604734
	<i>M. maximus</i> <sup>(1)</sup>	JN604735
	<i>M. maximus</i> <sup>(1)</sup>	JN604736
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604737
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604738
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604739
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604740
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604741
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604742
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604743
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604745
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604746
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604747
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604748
	<i>M. popelairianus</i> <sup>(1)</sup>	JN604749
	<i>M. separabilis</i> <sup>(1)</sup>	JN604744
	<i>M. oblongus</i> <sup>(2)</sup>	KJ546457
Streptaxidae	<i>Augustula braueri</i> (Martens 1898) <sup>(3)</sup>	HQ328370
	<i>Streptostele kilimanjaroensis</i> Blume 1965 <sup>(3)</sup>	HQ328274
Rhytididae	<i>Edentulina minor</i> (Morelet 1851) <sup>(4)</sup>	HQ328283

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Revisión de colecciones científicas y literatura

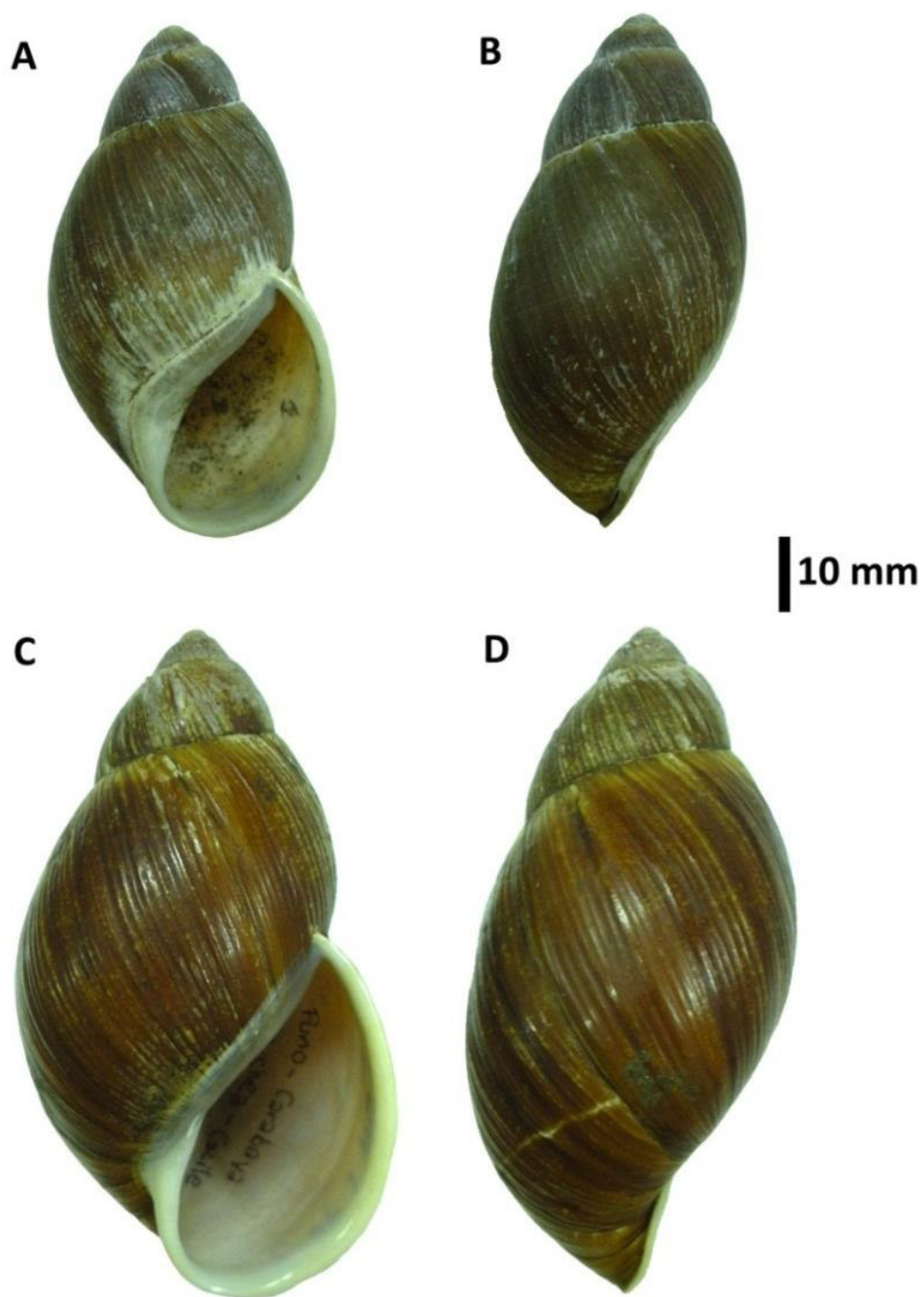
En base a la revisión de la literatura (Bequaert, 1948; 1949; Borda y Ramírez, 2013) se indica la existencia de cuatro especies de *Megalobulimus* para el sur de la vertiente oriental de los andes peruanos: *M. popelairianus*, *M. maximus*, *M. florezi* y *M. leucostoma*. Las dos últimas especies son las que presentan los tamaños poblacionales mayores (Borda obs. per). El panorama taxonómico de *M. florezi* fue dilucidado por Borda y Ramírez (2013), mientras que el estatus taxonómico de *M. leucostoma* se mantiene incierto. Según Bequaert (1948, 1949), *Megalobulimus leucostoma* está conformada por tres subespecies: *M. leucostoma leucostoma*, *M. leucostoma weyrauchi* y *M. leucostoma lacunosus*. La primera ha sido descrita para el norte de Cusco, el departamento de La Convención y Calca, y además en el departamento de Huánuco. La segunda ha sido descrita solo para Cusco, mientras que *M. leucostoma lacunosus* ha sido descrita para Puno y Bolivia. En el departamento de Puno, *M. leucostoma lacunosus* fue descrita para la provincia de Carabaya, la cual no es frontera con Bolivia y presenta un clima tropical. *Megalobulimus leucostoma leucostoma* presenta seis sinonimias las cuales Bequaert (1948) evalúa en detalle, concluyendo que los nombres específicos *leucostoma*, *mathiusii*, *mahogani*, *castelnaudi*, *hupeanus* y *dürfeldti* han sido basados en variantes individuales de una misma forma. *Megalobulimus leucostoma weyrauchi* no presenta sinonimias mientras que *M. leucostoma lacunosus* solo es sinonimizado con *Bulimus santa-cruzii* (Pfeiffer, 1868).

La revisión de las colecciones malacológicas del MUSM, NHMUK, FLMNH, FMNH y MCZ ha permitido evaluar algunas de estas sinonimias. Como resultado, es sabido que el holotipo de *Megalobulimus leucostoma leucostoma* se encuentra extraviado (J. Ablet com. per, NHM-UK). Que en la colección malacológica del NHM-UK existen dos sintipos de *Helix mathiusii* d'Orbigny 1835 (Figura 6), cuyo nombre es sinonimia de *M. leucostoma* (Bequaert, 1948), con código 1854.12.4.214 y

procedencia “Peru”. Las características externas de la conchilla de estos ejemplares guardan similitud con los ejemplares colectados para *M. l. leucostoma* (Figura 5).

Para el caso de la subespecie *M. leucostoma weyrauchi*, el holotipo y los paratipos se encuentran custodiados en la colección malacológica del MCZ bajo los códigos 166295 y 166296, respectivamente. Además, no presenta localidad de procedencia (Figura 7). Mientras que en el caso de la subespecie *M. leucostoma lacunosus*, tres especímenes tipos se encuentran custodiados en el NHM-UK con el código 1854.12.4.213 (Figura 8) bajo la denominación de *Helix lacunosus* d’Orbigny, 1835, procedentes de “Tutulima, Cochabamba, Bolivia”. Si se comparan estos individuos con los ejemplares de *Megalobulimus* sp. 1 procedente de Puno (Figura 5), se observan claras diferencias en cuanto a la vuelta corporal y la espira, ya que *Megalobulimus* sp. 1 muestra mayores proporciones con respecto a los ejemplares tipo de *M. leucostoma lacunosus*.

Dentro de las colecciones del MUSM y del FLMNH, códigos de colección MUSM 89 y 203086, respectivamente, se encuentran conchas bajo la nominación de *Megalobulimus anae* (Pilsbry) (Figura 9), cuya localidad tipo es Quillabamba (antes llamada Santa Ana) en la provincia de La Convención, departamento de Cusco. Esta nominación no tiene descripción original, además no existe mención de esta especie en los trabajos de Bequaert, ni en la lista de nombres de taxa dados por Pilsbry y revisados por Clench y Turner (1962). Dado que dichos especímenes presentan similitudes en las características de la concha y distribución a la subespecie *M. leucostoma leucostoma*, serán considerados así en los análisis a realizar.

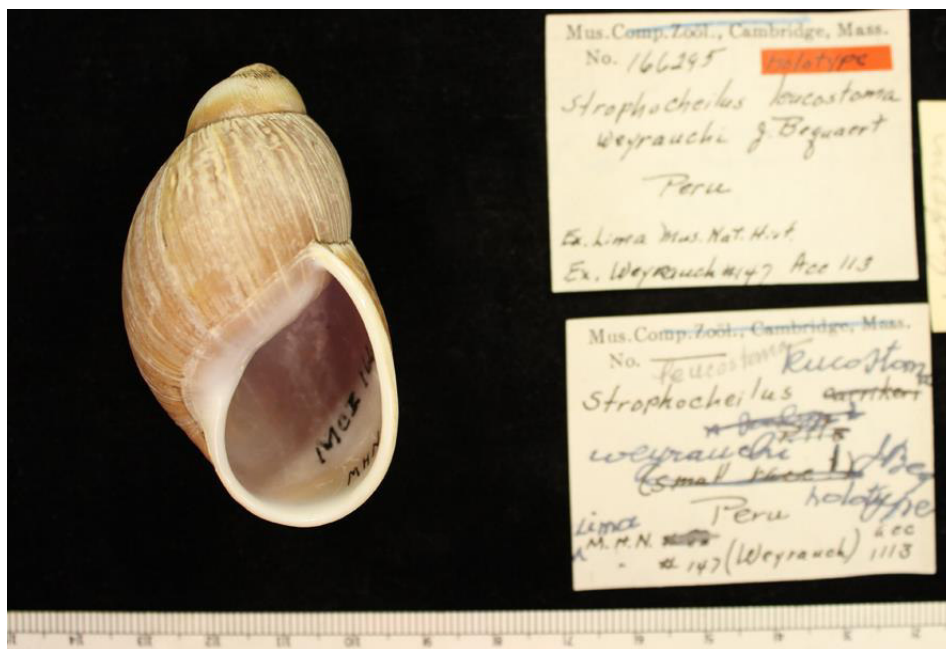


**Figura 5.** Subespecies de *Megalobulimus leucostoma* en vista frontal y lateral. (A) y (B) *M. leucostoma leucostoma* procedente de Echarate, Cusco. (C) y (D) *Megalobulimus* sp. 1 procedente de Carabaya, Puno.

Dentro de la colección de MUSM se encuentra un lote de 13 individuos cuya procedencia corresponde al departamento de Huancavelica, cuyas conchillas se asemejan en forma a las de *M. leucostoma*, pero de coloración castaño oscuro. También podría ser confundido con *M. separabilis* aunque la diferencia es que esta última presenta peristoma rosado, mientras que los primeros presentan peristoma blanco. No se tiene registro de alguna especie descrita para el departamento de Huancavelica. No se le ha encontrado correspondencia con alguna especie descrita, por lo que en el presente estudio son considerados como *Megalobulimus* sp. 2 (Figura 10) y debido a las similitudes de la concha con *M. leucostoma* será incluido en el análisis morfométrico. En resumen, en los siguientes análisis se considerarán los ejemplares tipo de *M. leucostoma* (*Helix mathiusii*, *Helix lacunosus* y *M.l. weyrauchi*), individuos de *M. leucostoma leucostoma*, *M. anae*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2.



**Figura 6.** *Helix mathiusii* d'Orbigny 1835, sinonimia para *Megalobulimus leucostoma leucostoma*, sintipo procedente de Perú. Código de espécimen 1854.12.4.214 custodiado NHMUK. Cortesía de NHMUK.

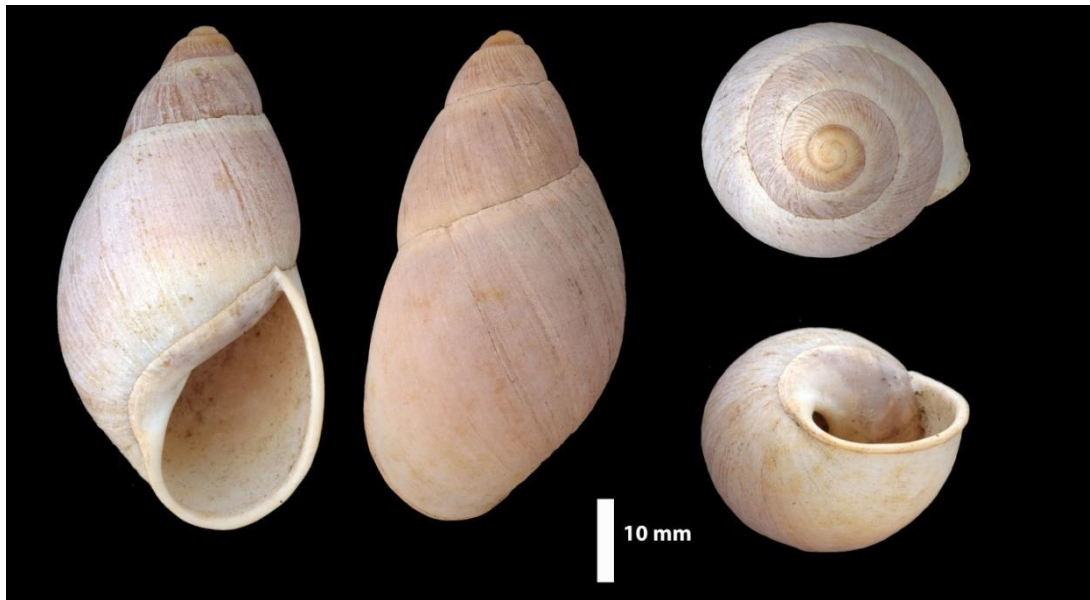


**Figura 7.** *Strophocheilus leucostoma weyrauchi* Bequaert, 1949, Holotipo de *Megalobulimus leucostoma weyrauchi*. Código de espécimen 166295, custodiado MCZ. Cortesía de MCZ.



**Figura 8.** *Helix lacunosus* d'Orbigny, 1835, sinonimia para *Megalobulimus leucostoma lacunosus*, sintipo procedente de la localidad de Tutulima, Cochabamba, Bolivia. Código de espécimen 1854.12.4.213 custodiado NHMUK. Cortesía de NHMUK.





**Figura 9.** *Megalobulimus anae* (Pilsbry) procedente de la localidad de Quillabamba custodiado en el Florida Museum of Natural History (N°203086).



**Figura 10.** Concha de *Megalobulimus* sp. 2 procedente de la localidad de Pichiu, dpto. de Huancavelica.

## 5.2. Morfometría

Para el desarrollo de los análisis de morfometría se tuvieron las siguientes consideraciones: Los ejemplares procedentes de Puno y Tambopata fueron considerados como *Megalobulimus* sp. 1, mientras que el material procedente de Huancavelica fue considerado como *Megalobulimus* sp. 2. La intención fue evaluar las similitudes de estos individuos con los ejemplares tipo para comprobar su identidad dado que *Megalobulimus* sp. 1 se encuentra dentro del rango de distribución de *M. l. lacunosus*. Se consideraron 98 individuos adultos, 72 individuos de *M. leucostoma leucostoma*, cinco de *M. leucostoma weyrauchi*, dos individuos de *M. anae*, dos de *Helix mathiusii*, dos de *Helix, lacunosus*, tres individuos de *Megalobulimus* sp. 1 y 13 de *Megalobulimus* sp. 2. No se incluyó a *M. florezi* dentro del análisis debido a que queda completamente diferenciada de todas las demás por las proporciones de la concha además de presentar un peristoma rojo.

### 5.2.1. Morfometría clásica:

Se realizó un análisis multivariado a partir de seis variables obtenidas de mediciones de la concha. Estas medidas fueron normalizadas y sometidas al Análisis de Componentes Principales (ACP). Las dos primeras componentes explicaron un 87.513% de la varianza total. La primera componente acumuló un 65.36% de la varianza total y la variable que explicó mejor dicha varianza fue la longitud de la espira. Mientras que la segunda componente acumuló 22.15% de la variabilidad total y la variable que explicó mejor esta variación fue la altura de la apertura (Tabla 3).



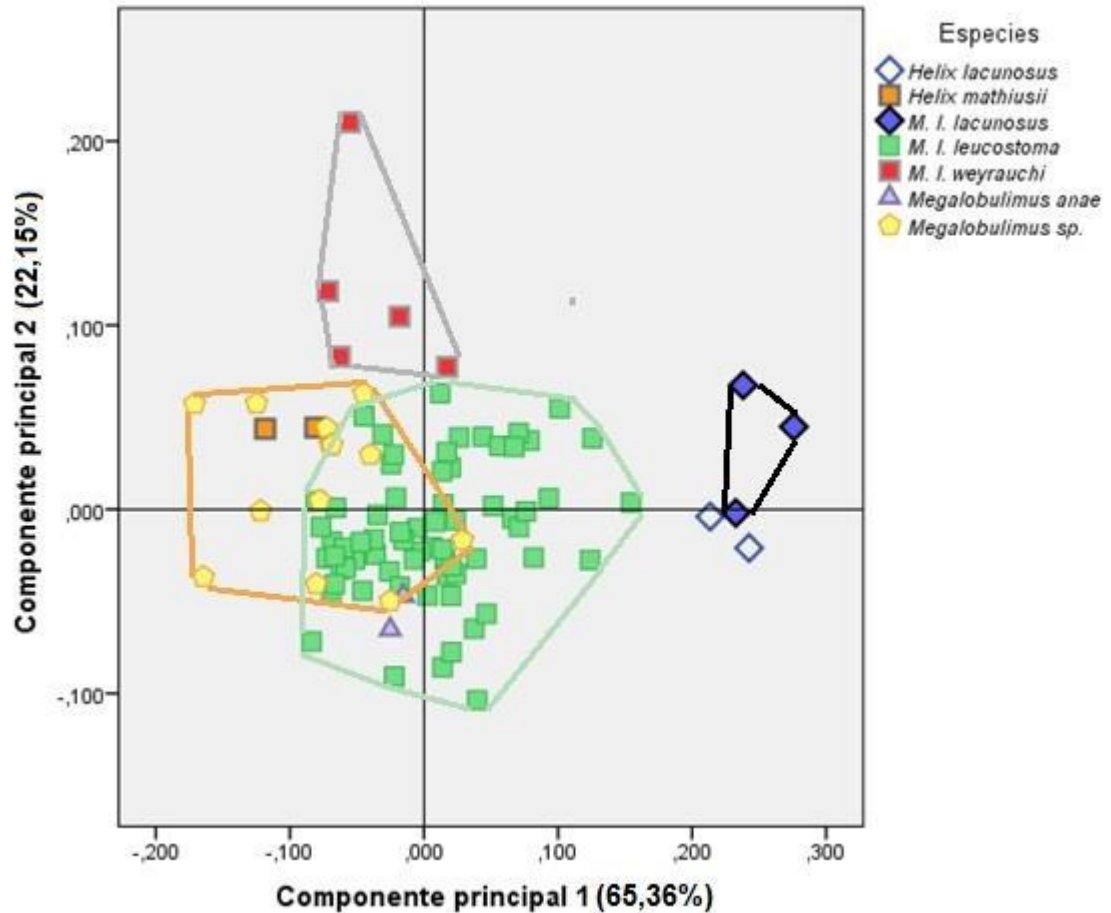
**Tabla 3.** Matriz de estructura del Análisis de Componentes Principales para 98 conchas de las especies en estudio.

Variables	Componentes principales		
	1	2	3
<b>Altura de la concha</b>	0,41006	-0,033238	0,26531
<b>Diámetro mayor de la concha</b>	0,29942	0,25282	0,38466
<b>Espira</b>	0,61693	-0,56927	-0,39731
<b>Posición del diámetro mayor</b>	0,41586	0,0080816	0,022131
<b>Altura de la apertura</b>	0,24528	0,71971	-0,63564
<b>Ancho de la apertura</b>	0,41006	-0,033238	0,26531
<b>Porcentaje de varianza explicada (%)</b>	<b>65,36</b>	<b>22,15</b>	<b>7,77</b>

En la gráfica de dispersión de puntos de las primeras dos componentes principales, es posible distinguir dos morfoespacios (Figura 11). En el primero, se observa la gran variabilidad de los individuos de *M. l. leucostoma* colectados en la provincia de La Convención; dentro de este morfoespacio es posible observar también la presencia de *M. anae* y *Megalobulimus* sp. 2, además muy cercano a este morfoespacio se encuentran *M. leucostoma weyrauchi* y *Helix mathiusi*. Más aún, los individuos de *H. mathiusii* se encuentran dentro del morfoespacio para *Megalobulimus* sp. 2. El encontrar a *M. leucostoma weyrauchi* muy cercano al amplio morfoespacio de la concha de la subespecie *M. leucostoma leucostoma*, indicaría que estos especímenes podrían corresponder a individuos de la subespecie *leucostoma* de menores proporciones. La presencia de *H. mathiusii* muy cercano al morfoespacio sugeriría la idea que la nominación de esta especie corresponde a una sinonimia de *M. leucostoma*. Sin embargo, estos ejemplares tipos se encuentran dentro del morfoespacio de *Megalobulimus* sp. 2. Este último presentan un morfoespacio que se sobrelapa con el de *M. leucostoma leucostoma*. Este sobrelapamiento se da sobre la región del morfoespacio que corresponde a los especímenes de *M. leucostoma* con menores proporciones.

En el segundo morfoespacio se observa la presencia de las conchas de mayores proporciones que corresponden a *Megalobulimus* sp. 1 y *Helix lacunosus*, siendo los individuos de *H. lacunosus* aquellos con la espira de mayor longitud. En cuanto a *Megalobulimus* sp.1, se observa que los individuos procedentes de Puno no mantienen cercanía a los especímenes tipo, esto sería un primer indicio para indicar su distinta naturaleza.

Dado que no se consiguió una completa discriminación al nivel de los individuos relacionados al morfoespacio de *M. leucostoma leucostoma*, se consideró realizar un análisis de morfometría geométrica.



**Figura 11.** Análisis de componentes principales basado en seis medidas obtenidas a partir de 98 conchillas para la discriminación entre las ejemplares tipo de las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma*, así como de *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *Megalobulimus anae*. El porcentaje de variación para cada componente se indica entre paréntesis.

### 5.2.2. Morfometría geométrica:

A partir del análisis de componentes principales para 24 coordenadas de los 12 *landmarks* se obtuvieron 20 componentes principales (PC). Las primeras dos componentes explicaron el 50.28% de la varianza total, la primera con 33.93% y la segunda con 16.35% (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cinco primeras componentes para el Análisis de Componentes Principales basado en variables de forma a partir 98 conchas para la discriminación entre las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma* así como *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *Megalobulimus anae*. Se indica el porcentaje de varianza para cada componente así como la varianza acumulada.

	Componente principal				
	1	2	3	4	5
Porcentaje de Varianza	33,934	16,353	11,017	7,178	6,846
% Varianza acumulada	33,934	50,287	61,305	68,482	75,329

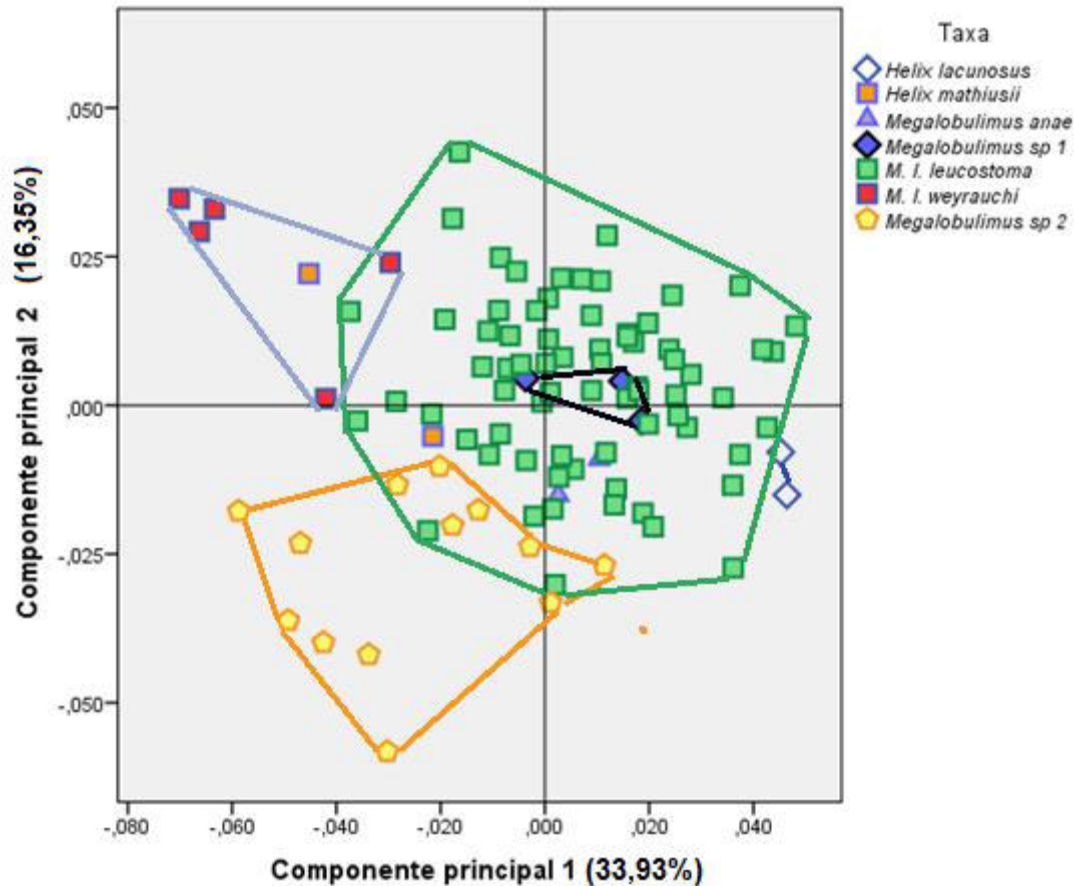
En la componente principal 1, la forma varió desde conchas más anchas, de protoconcha corta y de apertura más grande en su extremo más negativo a conchas más delgadas, con protoconcha más pronunciada y de apertura más pequeñas en su porción positiva. En el caso de la componente principal 2, se observaron conchas con espira corta en su extremo más negativo, cuya forma varió a conchas con espira más pronunciada en el extremo más positivo. En ambas componentes, los *landmarks* que mayor varianza acumularon fueron aquellos relacionados a la espira (Tabla 5).

En el gráfico se observa que *M. l. leucostoma* presenta diversas formas que van desde formas delgadas con espira aguda hasta formas semiovaladas con espiras obtusas. Los individuos de *H. lacunosus* se ubican preferentemente dentro de los cuadrantes correspondientes a las conchas con forma delgada y espira más pronunciada ubicándose en el extremo del morfoespacio de *M. l. leucostoma*. En el caso de *Megalobulimus* sp. 1 sus características de forma lo acercaron a los valores promedio de forma que presenta *M. l. leucostoma* independiente de las diferentes proporciones

que presentan dichos individuos. Los individuos de *Megalobulimus anae* encajan dentro del morfoespacio de *M. l. leucostoma*. Por otro lado, los individuos de *M. l. weyrauchi* y *H. mathiusii* se segregaron como los ejemplares con ápex más corto y vuelta corporal más expandida sin mostrar mucha diferenciación del morfoespacio de *M. l. leucostoma*. En el caso de *Megalobulimus* sp. 2 se discriminaron dos morfoespacios uno independiente de *M. l. leucostoma* y otro dentro del morfoespacio de esta subespecie, siendo la principal diferencia la forma de la espira. Los individuos del morfoespacio independiente a *M. l. leucostoma* presentaron una espira más corta que el otro grupo (Figura 12).

**Tabla 5.** Matriz de estructura de las cinco primeras componentes principales para las coordenadas de los 12 *landmarks* basados en variables de forma de 98 conchas para la discriminación entre las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma*, así como *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *Megalobulimus anae*.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
x1	-0,002387	0,056522	0,320058	-0,057072	-0,038541
y1	0,518729	0,007856	0,177689	0,104137	0,014084
x2	0,107586	0,086406	0,335221	0,034464	0,025685
y2	0,240729	-0,187675	-0,043023	0,016467	-0,123466
x3	-0,228695	-0,094691	0,121452	-0,200098	-0,134464
y3	0,023032	-0,158002	0,098128	-0,083604	-0,048085
x4	0,095225	0,033755	0,130413	0,070017	0,031741
y4	-0,043049	-0,124915	-0,261498	-0,073847	-0,121344
x5	-0,082438	-0,079976	-0,218182	-0,087053	-0,231736
y5	-0,190207	0,027647	-0,217305	-0,207097	-0,010100
x6	-0,029135	-0,032257	-0,173762	0,139495	0,171805
y6	-0,267282	0,083617	0,240318	0,513865	-0,242546
x7	-0,125561	-0,055645	-0,213646	0,124253	0,203776
y7	-0,378757	-0,034913	0,098051	0,072127	-0,154186
x8	-0,135174	-0,372023	-0,086200	0,034077	0,493465
y8	-0,327472	-0,023196	0,077236	-0,134826	0,005786
x9	0,255689	-0,024571	-0,367349	0,225146	-0,344706
y9	0,027451	0,663247	-0,380996	0,134729	0,270613
x10	0,154743	0,030529	-0,102616	-0,147226	-0,431341
y10	-0,040696	0,158850	0,130531	-0,173543	0,004236
x11	-0,039549	0,167348	-0,012256	-0,336779	0,111077
y11	0,281009	-0,001100	0,104713	-0,447897	0,168581
x12	0,029695	0,284604	0,266865	0,200774	0,143240
y12	0,156514	-0,411416	-0,023845	0,279490	0,236427



**Figura 12.** Análisis de componentes principales basado en variables de forma para la discriminación entre los ejemplares tipo de las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma*, así como *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *Megalobulimus anae*. El porcentaje de variación para cada componente se indica entre paréntesis.

A partir de los valores para los tres primeros componentes principales se desarrolló un análisis PERMANOVA o MANOVA no paramétrico. Para esto se consideraron cuatro grupos basados en cada subespecie de *M. leucostoma*, con *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2: grupo 1 (*M. l. leucostoma* + *Helix mathusii* + *Megalobulimus anae*); grupo 2 (*Megalobulimus* sp. 1 + *Helix lacunosus*), grupo 3 (*M. l. weyrauchi*) y grupo 4 (*Megalobulimus* sp. 2). PERMANOVA no reveló diferencias significativas entre los cuatro grupos (distancia Euclidiana:  $F = 26.03$ ,  $P < 0.0001$ ; distancia de Mahalanobis:  $F = 15.29$ ,  $P < 0.0001$ ). Sin embargo, si se examinan los

valores considerando pares de grupos es posible observar, en el caso de la distancia Euclidiana, una clara similitud entre *Megalobulimus leucostoma sensu stricto* y *weyrauchi*, así como para el par *M. l. leucostoma*- *Megalobulimus* sp. 2 y *M. l. lacunosus* con *Megalobulimus* sp. 2, para todos estos grupos la probabilidad de que se rechace la hipótesis de medias similares es menor a 0.0001. Mientras que en el caso del par *M. l. lacunosus* - *M. l. weyrauchi*, la similitud es no significativa. Para el caso de la distancia de Mahalanobis, se obtiene un resultado similar con la particularidad de que el par *M. l. lacunosus* - *M. l. weyrauchi* muestran un valor por encima del límite 0.01 pero este límite sería relativo ya que el límite para rechazar la hipótesis de similitud es  $p > 0.05$  (Tabla 6).

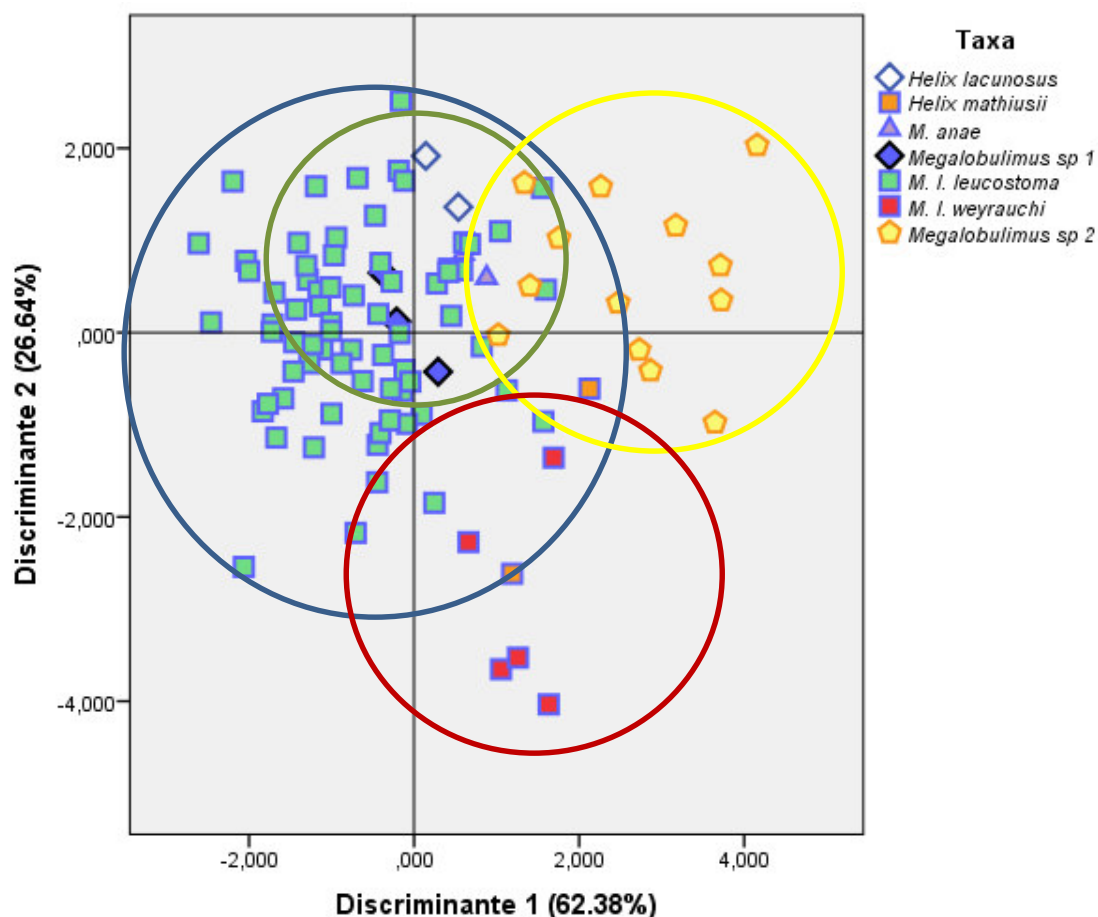


**Tabla 6.** P-values de pares de grupos para las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 2 producto del MANOVA no paramétrico a partir de los valores de las tres primeras componentes principales basadas en variables de forma. Se consideraron dos valores de distancia (Euclidiana y de Mahalanobis). El asterisco (\*) indica los valores significativos.

Distancia Euclidiana				
	<i>Megalobulimus</i> sp. 2	<i>M. l. leucostoma</i>	<i>M. l. weyrauchi</i>	<i>M. l. lacunosus</i>
<i>Megalobulimus</i> sp. 2		0.0001	0.0001	0.0001
<i>M. l. leucostoma</i>	0.0001		0.0001	0.0001
<i>M. l. weyrauchi</i>	0.0001	0.0001		0.0959*
<i>M. l. lacunosus</i>	0.0001	0.0001	0.0959*	
Distancia de Mahalanobis				
	<i>Megalobulimus</i> sp. 2	<i>M. l. leucostoma</i>	<i>M. l. weyrauchi</i>	<i>M. l. lacunosus</i>
<i>Megalobulimus</i> sp. 2		0.0001	0.0002	0.0004
<i>M. l. leucostoma</i>	0.0001		0.0001	0.0001
<i>M. l. weyrauchi</i>	0.0002	0.0001		0.0243*
<i>M. l. lacunosus</i>	0.0004	0.0001	0.0243*	

Por último, el análisis discriminante demuestra que, aunque es posible notar una mejor diferenciación, aún existe superposición entre los morfoespacios de los grupos. El factor discriminante 1, el cual acumuló 62.38% de la varianza, no es de mucha ayuda en la discriminación de los grupos. El factor discriminante 2, que acumuló 26.64% de la varianza, contribuye con una ligera diferenciación entre el grupo 2 (*M. l. lacunosus*) y el grupo 1 (*M. l. leucostoma* + *Helix mathiusii*), mientras que el grupo 3 se mantiene dentro de morfoespacio del grupo 1. Dentro del grupo 2 (*M. l. lacunosus*) se observa que, a pesar de haber sido considerados *a priori* como una misma entidad, los individuos que lo componen, *Helix lacunosus* y *Megalobulimus* sp. 1, no muestran

cercanía en sus relaciones de similitud. En el caso del grupo 4 (*Megalobulimus* sp. 2), se observa una mejor diferenciación, aunque no completa, del grupo1 (Figura 13).



**Figura 13.** Análisis discriminante basado en las tres primeras componentes producto del ACP para las variables de forma entre las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma*, así como *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *Megalobulimus anae*. El porcentaje de variación para cada factor discriminante se indica entre paréntesis.

Basados en los resultados de morfometría, se logró discriminar tres grupos: *M. l. leucostoma*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2. Ahora es necesario determinar si esta discriminación a nivel de concha se refleja también a nivel morfológico.

### 5.3. Morfología

En base a los morfoespacios diferenciados en el análisis morfométrico, se presenta la primera descripción de la morfología de *M. leucostoma sensu stricto*, *Megalobulimus* sp. 1 y de *Megalobulimus* sp. 2. Las descripciones están basadas en conchas y anatomía interna. En el caso de *M. florezi*, Borda & Ramírez (2013) publicaron una descripción detallada de la anatomía interna de esta especie, por lo cual no se desarrollará una descripción de su morfología.

#### **Taxonomía**

**Familia:** Strophocheilidae Pilsbry, 1902 (según Bouchet & Rocroi 2005, p. 267)

**Subfamilia:** Megalobuliminae Leme, 1973 (según Bouchet & Rocroi 2005, p. 267)

**Género:** *Megalobulimus* Miller, 1878

**Especie tipo:** *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774)

***Megalobulimus leucostoma leucostoma* (Sowerby, 1835)**

#### **Sinonimia (modificado de Bequaert (1948))**

*Bulinus leucostoma* Sowerby, 1835: 30.

*Helix (Cochlogena) mathiusii* d'Orbigny, 1835: 17.

*Bulimus (Bulimus) leucostoma*: Beck, 1837: 53.

*Bulimus mathiusii*: d'Orbigny, 1837: 303.

*Bulimus (Bulimus) mathewsii*: (sic Beck) Beck, 1837:53.

*Bulimus mahogani* Sowerby, 1838: fig 59 of Plate 137.

*Bulimus leucostoma*: Catlow y Reeve, 1845: 156.

*Bulimus mahogani*: Catlow y Reeve, 1845: 157.

*Bulimus leucostomus*: Pfeiffer, 1848: 23.

*Bulimus matthewsii*: (sic Pfeiffer) Pfeiffer, 1848:25.

*Bulimus (Borus) matthewsii*: (sic Albers) Albers, 1850: 142.

*Bulimus (Orphnus) magohani*: Albers, 1850: 146.

*Bulimus mathewsi*: (sic Adams) Adams & Adams, 1855: 146.

*Bulimus magohani*: Pfeiffer, 1855: 254.

*Bulimus castelnaudi* Hupé, 1857:254.

*Bulimus (Borus) castelnaudi*: v. Martens: 1876:9.

*Bulimus hupeanus*: Morelet, 1863:170.

*Bulimus dürfeldti*: Dohrn, 1863:152.

*Bulimus (Borus) dürfeldti*: v. Martens, 1876:50-51

*Bulimus (Borus) hupeanus* Pfeiffer, 1879:224.

*Strophocheilus (Borus) mathiusii*: Pilsbry, 1895: 17.

*Strophocheilus (Borus) hupeanus*: Pilsbry, 1895: 19.

*Strophocheilus (Borus) dürfeldti* Pilsbry, 1895: 51-52.

*Bulimus mathiusii*: Dall, 1912: 2.

*Bulimus lacunosus* Blume, 1920:129.

*Strophocheilus (Megalobulimus) leucostoma*: Bequaert, 1948: 127.

*Strophocheilus (Megalobulimus) leucostoma*: Flórez, 1970: 29.

*Megalobulimus leucostoma leucostoma*: Ramírez & Cáceres, 1991; Ramírez *et al.* 2003: 52.

**Localidad tipo de *Bulimus leucostoma*:** Perú

**Localidad tipo de *Helix mathiusii*:** Perú

**Material tipo:** El holotipo de *Bulinus leucostomus* de Sowerby se encuentra extraviado (Bequaert, 1948 y Ablett com. per NHM-UK). Dos sintipos de *Helix mathiusii* se encuentran albergados en el NHM-UK bajo el código 1854.12.4.214.

**Concha (Figura 5A-B, tabla 7):** Elongada y cónica. El diámetro mayor se ubica próximo a la mitad de la altura de la concha. Las vueltas embrionarias son aplanadas. Presenta costillas en su superficie así como pequeñas granulaciones. La abertura de la concha es elipsoide, peristoma blanco y ombligo está cerrado por el labio interno. El periostraco con coloración castaño-anaranjado. Los individuos bajo la nominación de

*Megalobulimus anae* (Figura 9) guardan gran similitud con los individuos de ésta en cuanto a las proporciones y características de la superficie de la concha

**Tabla 7.** Medidas de los especímenes de *M. leucostoma leucostoma*. Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.

	<i>M. leucostoma leucostoma</i> (n=71)		
Variables	Min (mm)	Max (mm)	Media $\pm$ Desviación estándar
Altura de la concha	64,42	80,2	70,53 $\pm$ 3,66
Diámetro mayor de la concha	34,72	45	39,31 $\pm$ 2,4
Altura de la espira	14	20,85	16,99 $\pm$ 1,44
Posición del diámetro mayor	33	43,35	37 $\pm$ 2,23
Ancho lateral	29,16	36,08	32,9 $\pm$ 1,74
Altura de la apertura	29,9	40,6	34,36 $\pm$ 2,45
Ancho de la apertura	15,78	22	18,5 $\pm$ 1.27
Número de vueltas	5	6,4	5.62 $\pm$ 0.24

**Sistema reproductor (Figura 14A-C):** Hermafrodita. Gónada adosada a la cara interna del lóbulo posterior de la glándula digestiva; está constituida por una serie de acinos glandulares que desembocan en un conducto hermafrodita. El diámetro de este conducto varía en todo su largo, pero siempre la porción central es la más dilatada y replegada. La parte distal de este conducto desemboca en el talón. Éste es una estructura esférica, adosada a la parte basal del saco glandular anexo. Este último se encuentra adosado a la región cóncava de la glándula de la albúmina. El saco

glandular anexo es una bolsa ciega, alargada y con apariencia granular. Su superficie interna es rugosa con pequeñas concavidades.

La glándula de la albúmina tiene forma arriñonada, volumen variable y coloración cremosa. Tanto el talón como el saco glandular anexo y la glándula de la albúmina desembocan en el espermoviducto mediante un conducto común en una zona denominada encrucijada.

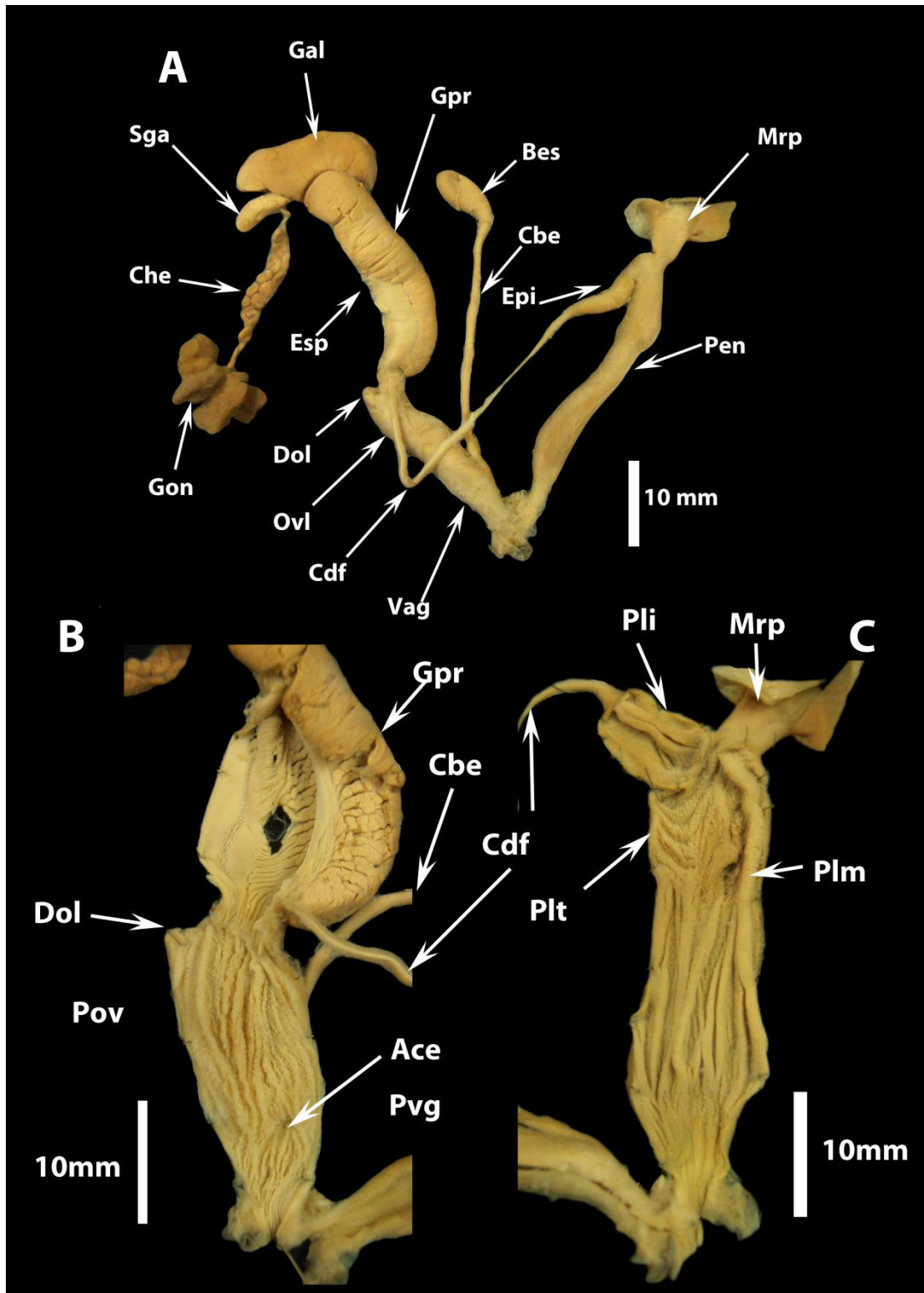
El espermoviducto presenta forma cilíndrica, ligeramente curvo, con pared muscular y de color cremoso. La glándula prostática se extiende en la superficie dorsal del espermoviducto, tiene coloración amarillenta y pliegues transversales. Internamente se distinguen dos zonas paralelas, una presenta superficie suave. La otra zona presenta pequeñas protuberancias a manera de placas en la región proximal, mientras que en la región distal se tornan en pliegues. Ambas zonas presentan coloración cremosa. La glándula prostática, en el interior del espermoviducto, presenta varios conductos que discurren paralelamente entre sí y transversalmente a la longitud de la glándula prostática y desembocan independientemente en un canal a lo largo de la glándula prostática. Este canal colector, que viene desde la encrucijada, se continúa con el conducto deferente que va encubierto por un corto trecho antes de su aparición en el exterior sobre el oviducto libre.

El oviducto libre es claramente muscular y presenta un divertículo externo a manera de bulbo que nace en el primer tercio de la longitud del oviducto, opuesto a la salida del conducto de la bursa espermatólítica. La superficie interna tiene numerosos pliegues de diferente grosor, distribución variable y donde destacan tres o cuatro pliegues como los más gruesos ubicados del lado de la salida del conducto de la bursa espermatólítica (Figura 14 y 15). Algunos de éstos se continúan en el interior del divertículo, que presenta pliegues uno de los cuales siempre es más desarrollado. La vagina es de menor o igual longitud que el oviducto libre. La superficie externa de la vagina es similar al oviducto libre; la superficie interna presenta pliegues de distribución variable y de menor espesor con relación a los pliegues del oviducto libre. El conducto

de la bursa espermatolítica es relativamente largo en relación al espermoviducto, y delgado, la bursa espermatolítica es piriforme y de volumen variable.

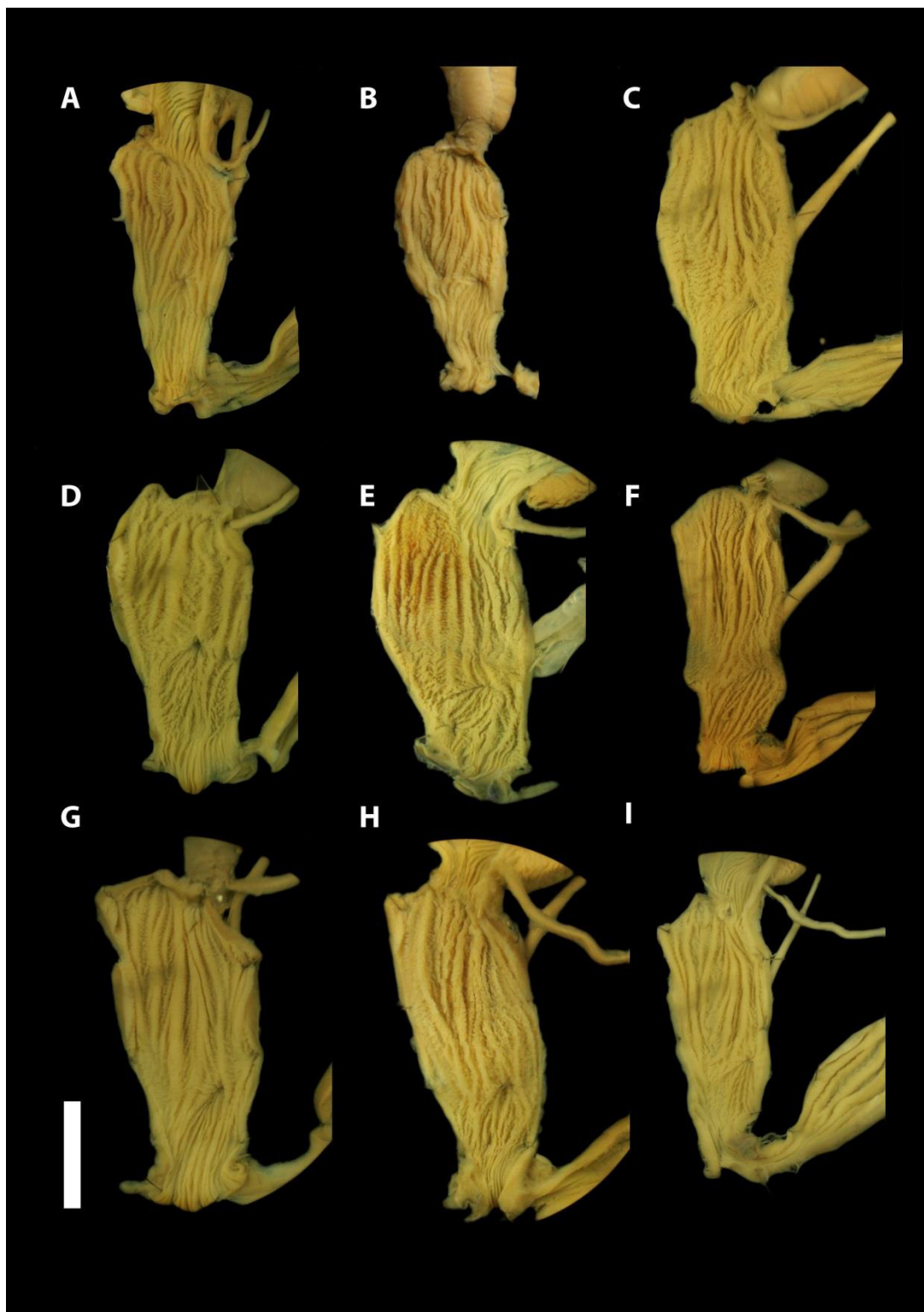
El conducto deferente es delgado y termina bruscamente en el epífalo que está plegado sobre el pene, está adosado por conectivos a la superficie del oviducto libre, vagina y pene. El epífalo tiene entre  $1/3$  y  $1/4$  de la longitud del pene. La superficie interna del epífalo presenta pequeñas granulaciones; sobresale un pliegue grueso que parte de la zona proximal y se bifurca al finalizar el primer quinto de la longitud del epífalo. Los pliegues originados presentan superficies homogéneas, su grosor aumenta conforme se aproximan al extremo distal mientras su altura disminuye llegando casi al ras de la superficie interna del epífalo de manera independiente. Se observa la presencia de un tercer pliegue, desde el inicio del epífalo hasta el límite con el pene, dicho pliegue es delgado, pero está casi al ras de la superficie interna del epífalo por lo que puede pasar desapercibido.

El pene muscular, presenta forma variable, desde semicilíndrica a cónica. El músculo retractor del pene se inserta en un solo punto y es de longitud variable. Internamente, presenta un patrón de distribución de pliegues muy constante a nivel de tercio proximal, existe un pliegue más grueso que los demás (pliegue mayor), el cual se extiende desde el extremo proximal y se bifurca al finalizar el primer tercio. A este mismo nivel se presentan pliegues a manera de rugosidades transversales y cuyo número y grosor puede variar. En el tercio medio y distal se observan bifurcaciones de los pliegues manteniendo un patrón irregular (Figura 14 y 16).



**Figura 14.** Sistema reproductor de *M. leucostoma leucostoma*. Individuos procedentes de la localidad de Sambaray, provincia de La Convención, departamento del Cusco (A) Genitalia completa. (B) Superficie interna del espermovíduco, oviducto libre y vagina. (C) Superficie interna del epífalo y pene.





**Figura 15.** Variabilidad de la superficie interna de la genitalia femenina en especímenes de *M. leucostoma* procedentes de Cusco. (A) y (B) Pavayoc, (C), (D) y (E) Huyro, (F) Santa María, (G) Chaullay, (H) Sambaray y (I) Echarate.



**Figura 16.** Variabilidad de la superficie interna de la genitalia masculina en especímenes de *M. leucostoma* procedentes de Cusco. (A) y (B) Pavayoc, (C), (D) y (E) Huyro, (F) Santa María, (G) Chaullay, (H) Sambaray y (I) Echarate.

### ***Megalobulimus* sp. 1**

#### **Concha (Figura 5C-D, tabla 8):**

Elongada y cónica. El diámetro mayor se ubica próximo a la mitad de la altura de la concha. Las vueltas embrionarias son aplanadas, la vuelta corporal presenta un volumen más amplio en proporción a la otra subespecie. La espira es ligeramente más aguda que el típico *leucostoma*. Presenta costillas suaves en su superficie. La abertura de la concha es elipsoide, el peristoma presenta coloración blanca y el ombligo está cerrado por el labio interno. El periostraco presenta coloración marrón-anaranjado.

**Tabla 8.** Medidas de los especímenes de *Megalobulimus* sp. 1. Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.

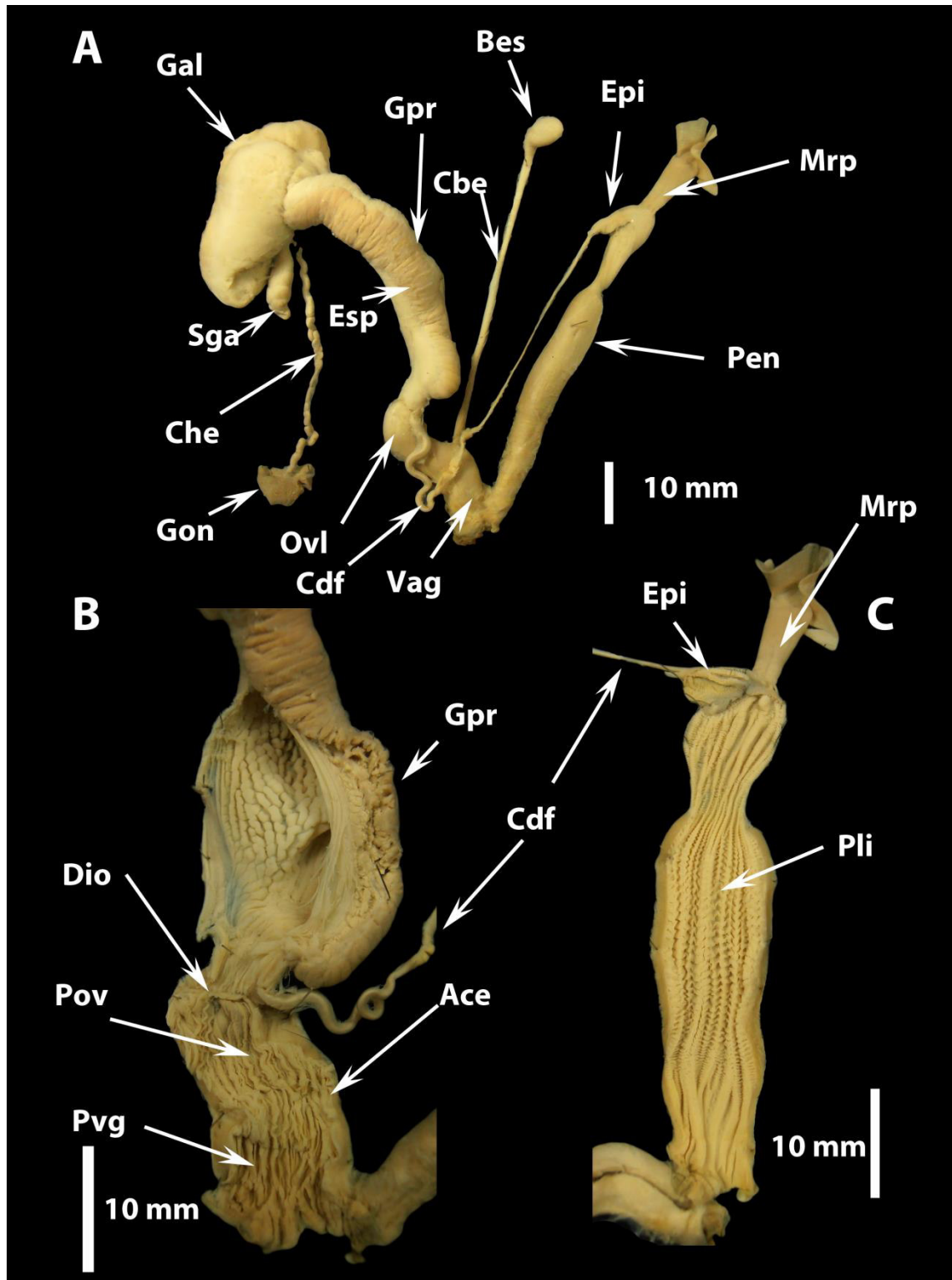
	<i>Megalobulimus</i> sp. 1 (n=3)		
Variables	Min (mm)	Max (mm)	Media $\pm$ Desviación estándar
Altura de la concha	86,2	89,55	87,38 $\pm$ 1,88
Diámetro mayor de la concha	45,15	49,45	47,81 $\pm$ 2,33
Altura de la espira	21,45	23,3	22,58 $\pm$ 0,99
Posición del diámetro mayor	45,75	46,8	46,17 $\pm$ 0,56
Ancho lateral	38,75	41,25	40,08 $\pm$ 1,26
Altura de la apertura	43,05	44,8	43,67 $\pm$ 0,98
Ancho de la apertura	20,95	24,05	22,82 $\pm$ 1,64
Número de vueltas	5,55	5,6	5,58 $\pm$ 0.02

### **Sistema reproductor (Figura 17):**

Las estructuras que lo componen son similares a las del sistema reproductor de *M. leucostoma leucostoma* con las siguientes diferencias.

El oviducto no presenta divertículo externo, pero sí se observa en su superficie interna una invaginación denominada “divertículo interno del oviducto” por Borda (2011) y la cual se ubica en una posición homóloga al divertículo externo del oviducto descrito para *M. l. leucostoma*. La superficie interna del oviducto presenta pliegues más delgados. Los pliegues del oviducto son del mismo grosor que los de la vagina. La longitud de esta última es 2/3 de la del oviducto.

El epífalo tiene aproximadamente 1/5 de la longitud del pene y su grosor es aproximadamente la mitad del grosor del tercio proximal del pene. El pliegue que se origina en la región proximal del epífalo se bifurca al finalizar el tercio anterior y estos dos nuevos pliegues, bastante gruesos, discurren paralelos sin volver a unirse manteniendo la altura y el grosor. No se presenta un tercer pliegue. El pene presenta forma de botella. Externamente, el tercio proximal es delgado, al finalizar sufre una constricción para luego ensancharse abruptamente e iniciar el tercio medio y mantener un ancho constante hasta finalizar el tercio distal. La superficie interna del pene presenta pliegues de superficie rugosa y con escasas bifurcaciones en el tercio proximal y medio. En el tercio medio y la mitad del tercio distal, los pliegues tienen disposición ondulada. La superficie de los pliegues en el tercio distal se vuelve suave y además presentan algunas bifurcaciones.



**Figura 17.** Sistema reproductor de *Megalobulimus* sp. 1 procedente de la provincia de Carabaya, departamento de Puno. (A) Genitalia completa. (B) Superficie interna del espermoviducto, oviducto libre y vagina. (C) Superficie interna del epífalo y pene.

## ***Megalobulimus* sp. 2**

### **Concha (Figura 10, tabla 9):**

Elongada y cónica. El diámetro mayor se ubica próximo a la mitad de la altura de la concha. Las vueltas embrionarias son aplanadas. El ápice de la concha es romo. Presenta costillas suaves en su superficie. La abertura de la concha es elipsoide, el peristoma presenta coloración blanca y el ombligo está cerrado por el labio interno. El periostraco presenta coloración marrón, pero la superficie próxima a las suturas es de color naranja.

**Tabla 9.** Medidas de los especímenes de *Megalobulimus* sp. 2. Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.

	<i>Megalobulimus</i> sp. 2 (n=13)		
Variables	Min (mm)	Max (mm)	Media $\pm$ Desviación estandar
Altura de la concha	57,28	63,92	60,6 $\pm$ 4,69
Diámetro mayor de la concha	34,38	35,22	34,8 $\pm$ 0,59
Altura de la espira	13,52	14	13,76 $\pm$ 0,34
Posición del diámetro mayor	32,44	34,82	33,63 $\pm$ 1,68
Ancho lateral	27,66	28,16	27,91 $\pm$ 0,35
Altura de la apertura	28	30,02	29,01 $\pm$ 1,42
Ancho de la apertura	16,46	17,36	16,91 $\pm$ 0,64
Número de vueltas	5,2	5,2	5,2 $\pm$ 0,0

### **Sistema reproductor (Figura 18A-C):**

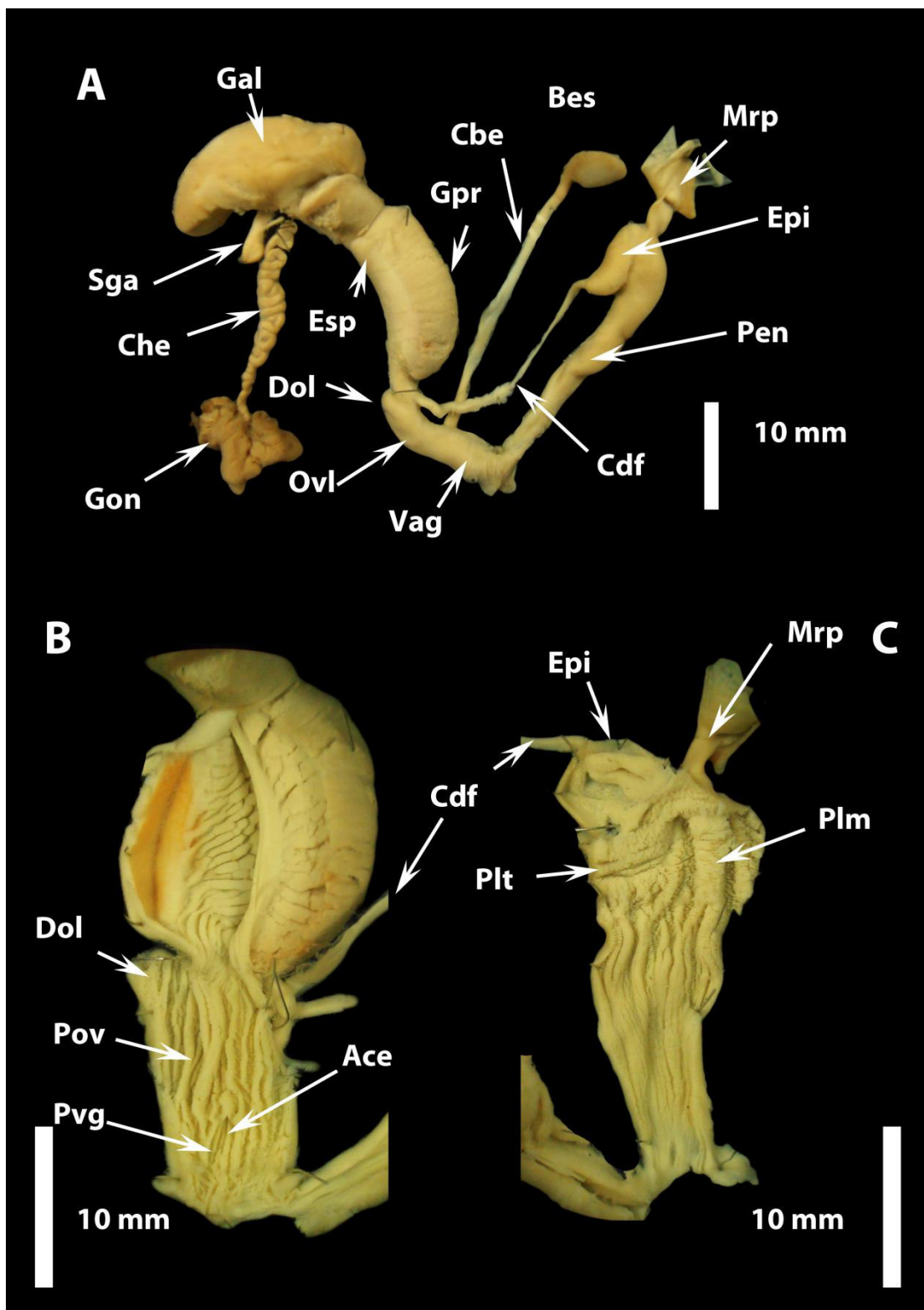
Las estructuras que lo componen son similares a las del sistema reproductor de *M. leucostoma leucostoma* con las siguientes diferencias.

El espermoviducto presenta dos zonas en su superficie interna, una de relieve suave y otra con pliegues longitudinales.

El oviducto presenta pliegues delgados y numerosos con respecto a *M. leucostoma leucostoma*. El divertículo del oviducto libre es proporcionalmente más grande que el presente en *M. l. leucostoma*. La superficie interna de la vagina, los pliegues son más delgados y numerosos que los del oviducto libre. La longitud de esta última es 1/2 de la del oviducto.

Genitalia masculina de apariencia muscular, el epífalo se muestra adosado al pene, sujeto por conectivos y tiene aproximadamente 1/5 - 1/3 de la longitud del pene. Su grosor es similar al del tercio distal del pene. En la superficie interna, el pliegue que se origina en la región proximal del epífalo se bifurca al finalizar el tercio proximal y estos dos nuevos pliegues discurren paralelos sin volver a unirse. A lo largo de su recorrido, estos nuevos pliegues pierden altura y van ganando ancho. No se presenta un tercer pliegue. El pene presenta forma variable desde tubular hasta forma de garrote. Internamente presenta una distribución de los pliegues peneales muy similar a *M. leucostoma leucostoma*. El tercio proximal de la superficie interna presenta un pliegue mayor que abarca toda la longitud del tercio, además presentan pliegues transversales cuyo número puede variar entre dos a cuatro. El tercio medio es la región donde la gran mayoría de los pliegues se bifurca dando una apariencia de red. En el tercio distal se continúan los pliegues pero con altura disminuida, además las rugosidades de sus superficies se hacen cada vez menos conspicuas.





**Figura 18.** Sistema reproductor de *Megalobulimus* sp. 2. Individuo procedente de la localidad de Pichiu, provincia de Tayacaja, departamento de Huancavelica. (A) Genitalia completa. (B) Superficie interna del espermoviducto, oviducto libre y vagina. (C) Superficie interna del epífalo y pene.

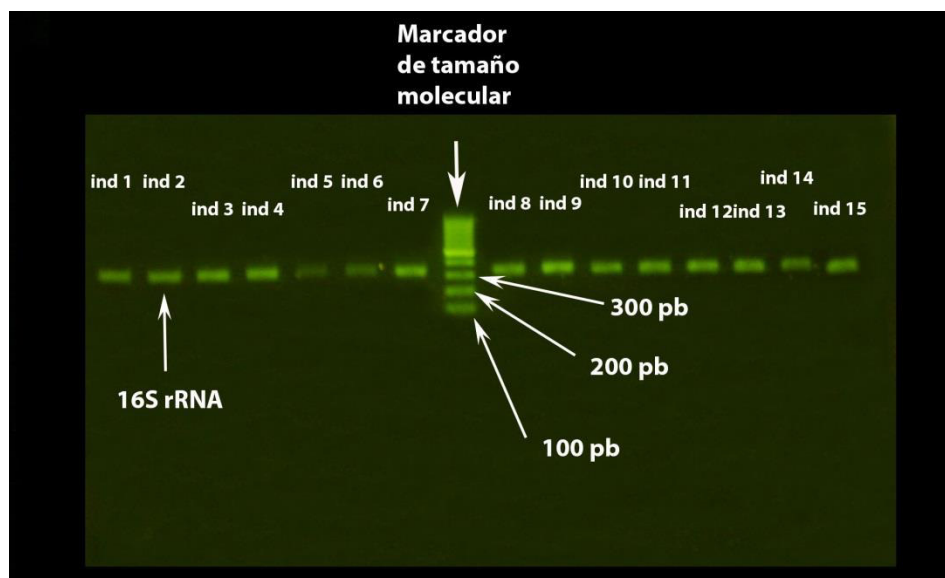


## 5.4. Análisis Molecular

### 5.4.1. Marcador mitocondrial RNA ribosomal subunidad 16S (16S rRNA)

#### 5.4.1.1. Amplificación y descripción de las secuencias

Se obtuvieron un total de 40 secuencias del marcador 16S rRNA para *M. leucostoma leucostoma* para 9 localidades de Cusco (Tabla 2), cinco secuencias para *M. florezi* de cinco localidades de Cusco (Quillabamba, Pavayoc, Santa María, Chaullay y Echarate), dos secuencias para *Megalobulimus* sp. 1 procedentes de una localidad de Puno (San Gaban) y siete para *Megalobulimus* sp. 2 procedentes de Huancavelica. En todos los casos el amplificado mostró un tamaño aproximado a 340 pb (Figura 19). La composición de bases pirimidínicas fue similar entre *M. leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 1, pero no se observó una similitud significativa con *M. florezi* tanto para las bases púricas como pirimidínicas. Para *Megalobulimus* sp. 2 se pudo observar que tiene un contenido ligeramente menor de timinas que se compensa con un ligero aumento en las citosinas (Tabla 10).



**Figura 19.** Gel de electroforesis de amplificados para el marcador 16S RNA de *M. leucostoma*. Se observó que todos los carriles muestran la presencia del amplificado con un tamaño entre 300 y 400 pb.

**Tabla 10.** Promedio de la frecuencia de bases de las secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA. T= Timina, C=Citosina, A=Adenina, G= Guanina, Tam (pb)= Tamaño en pares de bases, N= Número de secuencias.

Especie	T	C	A	G	Long	N
<i>M. leucostoma leucostoma</i>	34,6	12,9	33,7	18,8	324	40
<i>Megalobulimus</i> sp. 1	35,1	12,2	32,7	20,0	332	2
<i>M. florezi</i>	33,6	11,6	33,3	21,4	327	5
<i>Megalobulimus</i> sp. 2	32,7	13,1	33,0	21,1	327	7

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a un análisis de comparación haciendo uso de la herramienta BLAST del NCBI (Tabla 11). En todos los casos se corroboró que las secuencias obtenidas correspondieron al marcador mitocondrial 16S rRNA de moluscos.

**Tabla 11.** Resultados de la evaluación de las secuencias de 16S rRNA de los taxa en estudio, realizada con la herramienta nBLAST en el GenBank.

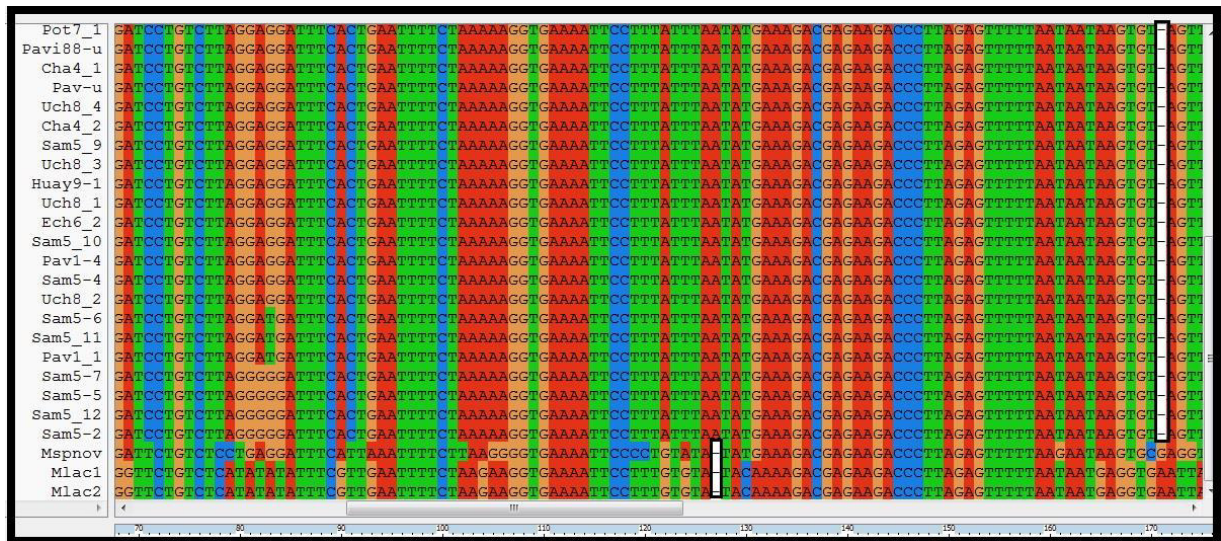
Especie	Mejor hit en nBLAST	Familia	Gen	#de accesoión	Valor de E	% de identidad	% de cobertura
<i>M. leucostoma leucostoma</i>	<i>M. lichtensteini</i>	Strophocheilidae	16S rRNA	<a href="#">JN604731.1</a>	4E-95	87%	100
<i>Megalobulimus</i> sp. 1	<i>M. lichtensteini</i>	Strophocheilidae	16S rRNA	<a href="#">JN604731.1</a>	7E-88	85%	100
<i>M. florezi</i>	<i>M. capillaceus</i>	Strophocheilidae	16S rRNA	<a href="#">JN604725.1</a>	9E-170	100%	100
<i>Megalobulimus</i> sp. 2	<i>M. lichtensteini</i>	Strophocheilidae	16S rRNA	<a href="#">JN604731.1</a>	8E-90	90%	100

#### 5.4.1.2. Distancia genética entre especies *Megalobulimus*

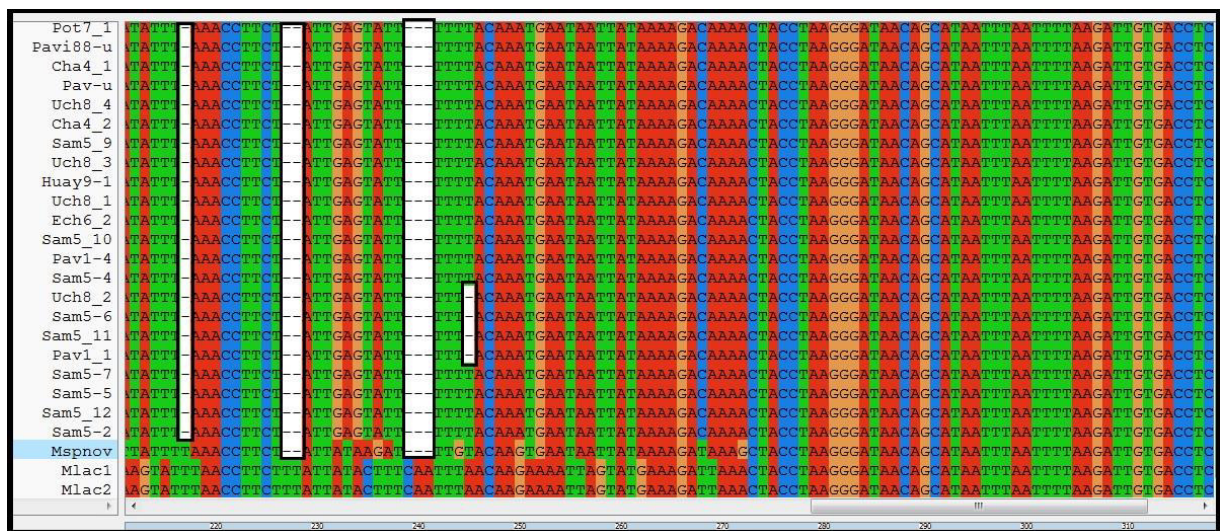
Con el objetivo de establecer la relación de similitud entre las especies de *Megalobulimus* presentes en el área de estudio se realizó un alineamiento de secuencias múltiples, seguido de un análisis de distancia genética.

##### a. Alineamiento de secuencias múltiples

El alineamiento de la secuencia del marcador 16S rRNA resultó en 328 sitios, con presencia de *indels* (inserción-delección). La primera región del alineamiento se mantiene conservada pues corresponde a la región de hibridación del *primer*. Las secuencias de *M. leucostoma leucostoma* muestran gran homogeneidad diferenciándose claramente de *Megalobulimus* sp. 1 y de *Megalobulimus* sp. 2. Dentro de los primeros 180 sitios es posible observar la presencia de dos *gaps* de un solo nucleótido. El primero, en el sitio 125 es una adenina ausente en *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2, mientras que el segundo *gap* está presente en todas las secuencias de *M. leucostoma leucostoma* en la posición 169 (Figura 20), en donde para otras hay guanina y adenina. Para la región siguiente se observa la presencia de cuatro *gaps*, el primero característico de *M. leucostoma leucostoma* en el sitio 217. Los dos *gaps* siguientes abarcan dos y tres sitios (en 227-228 y 239-241), respectivamente. Ambos están presentes en *M. leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 2. Por último, un *gap* está presente en cuatro individuos de diferentes localidades de *M. leucostoma leucostoma* (Figura 21).



**Figura 20.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S rRNA para los especímenes de *M. leucostoma leucostoma*, *M. florezi*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2 en el programa Clustal x2, entre los sitios 70 y 170. Los recuadros de borde negro indican la presencia de *gaps* en los primeros 180 nucleótidos.



**Figura 21.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S rRNA para los especímenes de *M. leucostoma leucostoma*, *M. florezi*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2 en el programa Clustal x2 entre los sitios 210 y 320. Los recuadros de borde negro indican la presencia de *gaps*.

## b. Distancia genética

La distancia genética entre y dentro de las especies fue calculada con el programa Mega 5 (Tabla 12). La distancia observada entre los individuos de *M. leucostoma leucostoma* fue realmente baja (0,005), mientras que para los dos individuos de *Megalobulimus* sp. 1 fue 0,006. En el caso de *Megalobulimus* sp. 2, el valor de distancia genética entre los individuos fue 0,00 dado que las siete secuencias obtenidas fueron idénticas. Este mismo patrón se observó para las cinco secuencias de *M. florezi*. Por otro lado, la distancia genética observada entre *M. leucostoma leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 1 es bastante alta (0,194), mientras que entre *M. leucostoma leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 2 la distancia es menor (0,153), pero se mantiene considerablemente alta. Además, todas las taxa mantienen una distancia mayor a 20% (0,20) de *Megalobulimus florezi*.

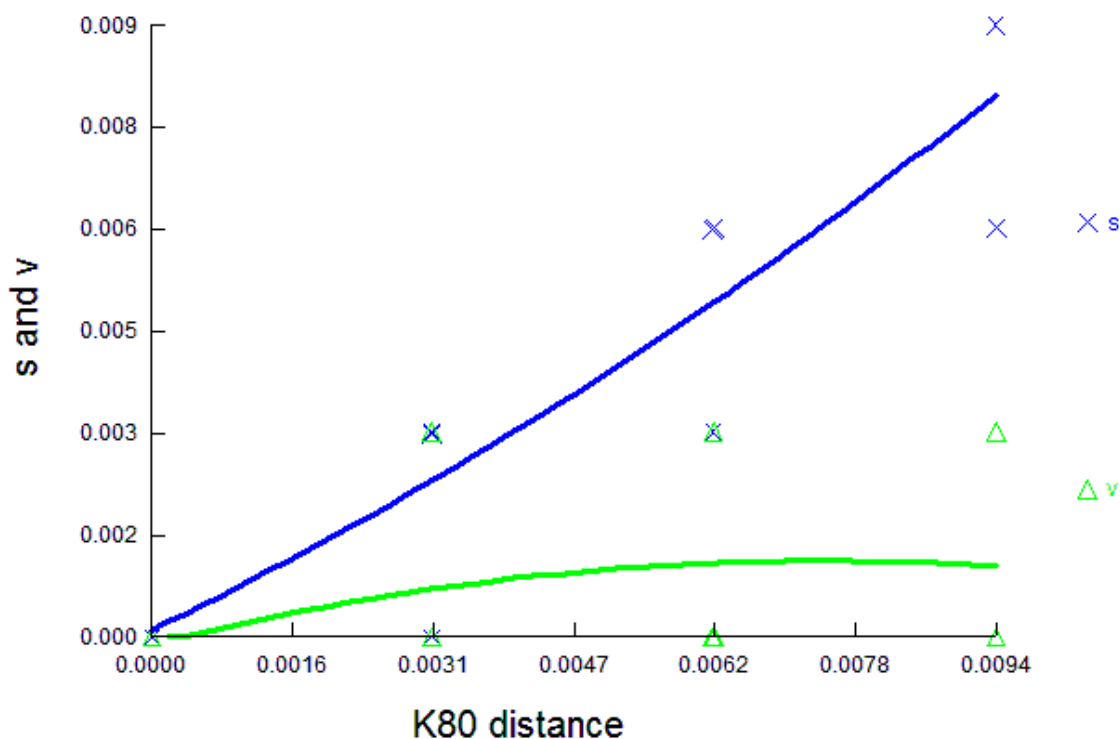
**Tabla 12.** Distancia genética a pares corregida (Kimura 2 parámetros) del marcador mitocondrial 16S rRNA dentro y entre cuatro taxa en estudio.

	<i>M. leucostoma leucostoma</i>	<i>Megalobulimus</i> sp. 1	<i>Megalobulimus</i> sp. 2	<i>Megalobulimus florezi</i>
<i>M. leucostoma leucostoma</i>	0,005	0,194	0,153	0,209
<i>Megalobulimus</i> sp.1		0,006	0,234	0,240
<i>Megalobulimus</i> sp. 2			0,00	0,297
<i>Megalobulimus florezi</i>				0,00

## c. Evaluación de la calidad de las secuencias

En el caso de las secuencias de *M. leucostoma leucostoma*, la gráfica de transiciones y transversiones *versus* las distancias corregidas Kimura 2 parámetros es lineal en el caso de las transiciones, la cual indica que no ha llegado a la saturación. En el caso

de las transversiones no hay evidencia saturación, la curva se muestra con una pendiente que muestra un mínimo crecimiento (Figura 22).



**Figura 22.** Gráfica de transiciones (s) y transversiones (v) para el marcador mitocondrial 16S rRNA para los individuos de *M. leucostoma leucostoma* comparadas con la distancia genética corregida Kimura 2 parámetros (K80).

#### 5.4.1.3. Diversidad genética

Los cálculos de diversidad genética se llevaron a cabo solo en especímenes de *M. leucostoma leucostoma* dado que *Megalobulimus* sp. 1 presentó sólo dos secuencias, aunque ambas diferentes (dos haplotipos), mientras que *Megalobulimus* sp. 2 y *M. florezi* presentaron un único haplotipo para cada taxa.

El alineamiento de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de *M. leucostoma leucostoma* tiene un tamaño de 324 sitios. Presenta 318 sitios invariables y cinco variables, dentro de los cuales cuatro son filogenéticamente informativos y un



*singleton*. Las secuencias se agruparon en siete haplotipos considerando *gaps*. La diversidad haplotípica es alta (0,6897) mientras que la diversidad nucleotídica  $P_i$  es muy baja (0,00265) lo cual nos indica que a pesar de que tenemos siete haplotipos dentro de las secuencias, éstas se diferencian por un pequeño número de mutaciones.

Considerando las nueve localidades de procedencia, la localidad de Huyro presentó un haplotipo único (H1) y exclusivo, es decir que no se presentó en las otras localidades. Las demás poblaciones dentro de cada localidad no mostraron estructuración geográfica, siendo que un haplotipo se presentó en siete localidades (H2); son seis los sitios que definen estos haplotipos, dentro de los cuales, la posición 236 presenta *gaps* para los haplotipos H4 y H5 (Tabla 13).

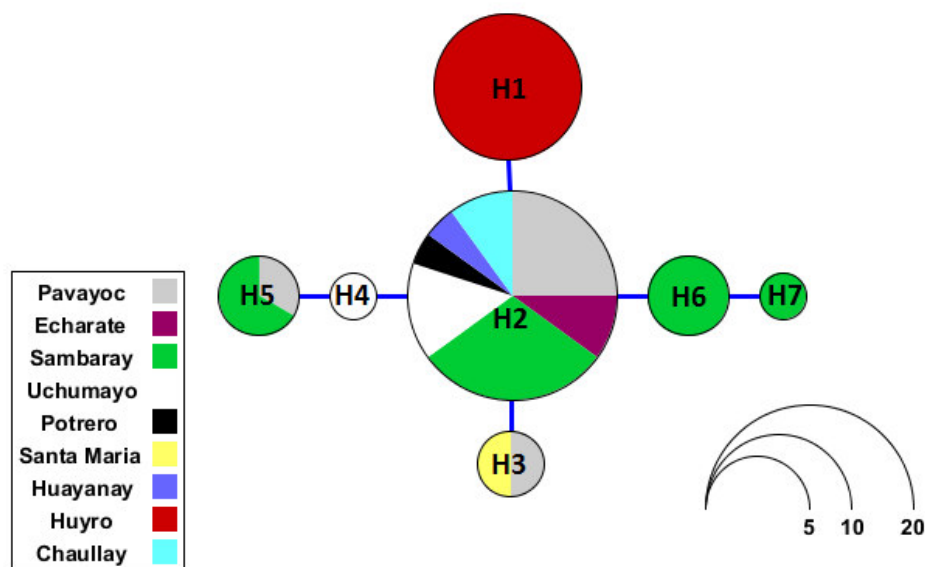
**Tabla 13.** Lista de especímenes de *M. leucostoma leucostoma* indicando procedencia, haplotipo (H) perteneciente y posiciones variables para el marcador mitocondrial 16S rRNA. T= Timina, A=Adenina, G= Guanina, C=Citosina, (.) =nucleótido similar, (-) = *gap*.

Especimen	Haplotipo	Posiciones variables					
		56	80	81	168	174	236
Huyro-1	H1	T	A	G	T	C	T
Huyro-2	H1	.	.	.	.	.	.
Huyro-3	H1	.	.	.	.	.	.
Huyro-4	H1	.	.	.	.	.	.
Huyro-5	H1	.	.	.	.	.	.
Huyro-6	H1	.	.	.	.	.	.
Huyro-7	H1	.	.	.	.	.	.
Huyro-8	H1	.	.	.	.	.	.
Huyro-9	H1	.	.	.	.	.	.
Huyro-10	H1	.	.	.	.	.	.
Echarate-1	H2	C	.	.	.	.	.
Echarate-2	H2	C	.	.	.	.	.
Sambaray-1	H2	C	.	.	.	.	.
Sambaray-3	H2	C	.	.	.	.	.
Sambaray-4	H2	C	.	.	.	.	.
Sambaray-8	H2	C	.	.	.	.	.
Sambaray-9	H2	C	.	.	.	.	.
Sambaray-10	H2	C	.	.	.	.	.
Pavayoc-2	H2	C	.	.	.	.	.
Pavayoc-3	H2	C	.	.	.	.	.
Pavayoc-4	H2	C	.	.	.	.	.
Pavayoc-6	H2	C	.	.	.	.	.
Pavayoc-u	H2	C	.	.	.	.	.
Huayanay-1	H2	C	.	.	.	.	.
Uchumayo-1	H2	C	.	.	.	.	.
Uchumayo 3	H2	C	.	.	.	.	.
Uchumayo-4	H2	C	.	.	.	.	.
Potrero-1	H2	C	.	.	.	.	.
Chaulay-1	H2	C	.	.	.	.	.
Chaulay-2	H2	C	.	.	.	.	.
Santa Maria-1	H3	C	.	.	C	.	.
Pavayoc-5	H3	C	.	.	C	.	.
Uchumayo-2	H4	C	.	.	.	.	-
Sambaray-6	H5	C	.	T	.	.	-
Sambaray-11	H5	C	.	T	.	.	-
Pavayoc-1	H5	C	.	T	.	.	-
Sambaray-7	H6	C	G	.	.	.	.
Sambaray-5	H6	C	G	.	.	.	.
Sambaray-12	H6	C	G	.	.	.	.
Sambaray-2	H7	C	G	.	.	T	.



#### 5.4.1.4. Red de haplotipos

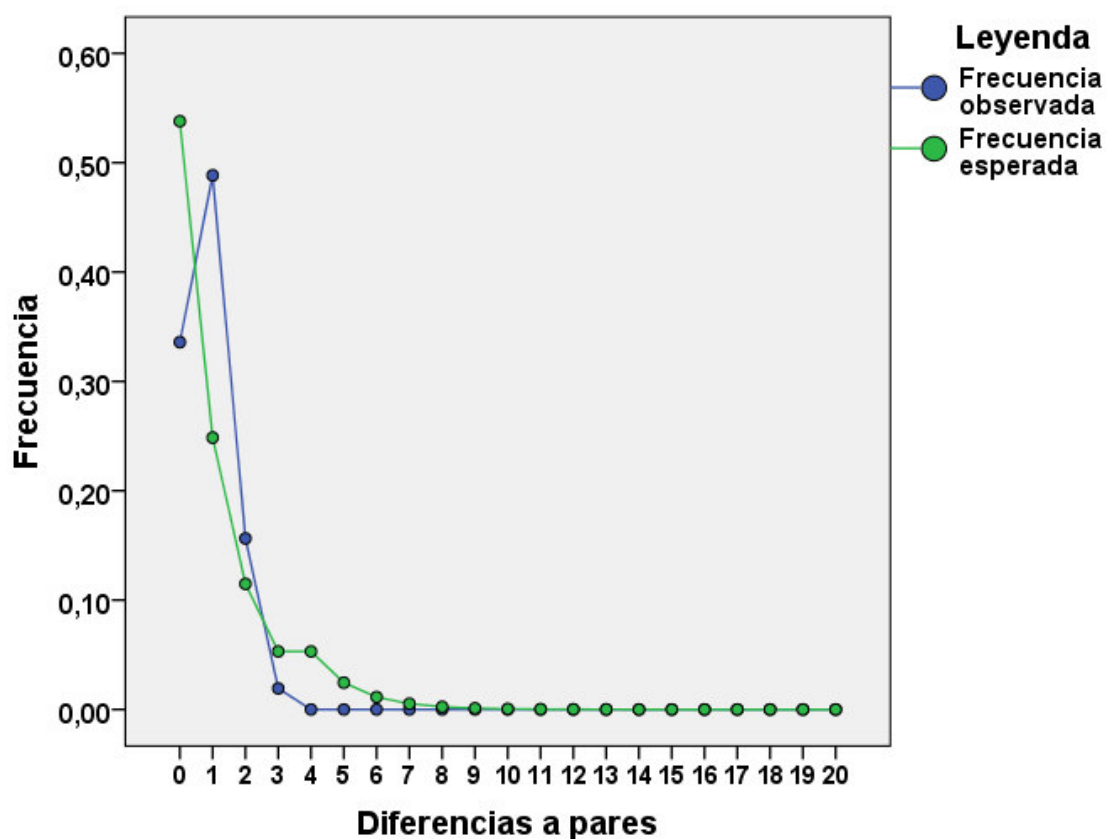
Para establecer los patrones demográficos y flujo génico se desarrolló una red de haplotipos para los 40 especímenes de *M. leucostoma leucostoma* que fueron agrupados en 7 haplotipos. La topología observada es la de estrella (*star-like topology*), que es un sello diferencial del modelo de demografía histórica “cuello de botella genético seguido de un rápido crecimiento y expansión poblacional” (Slatkin y Hudson, 1991). La particularidad es que el haplotipo H2 fue el más frecuente, ocupó la posición central y la mayoría de los otros haplotipos se diferenciaron de él por tan solo una mutación, resultando en la característica topología en estrella. La frecuencia del haplotipo (H1) fue la mitad del haplotipo central (H2). El haplotipo más común (H2) estuvo presente en la mayoría de las localidades; otros dos haplotipos estuvieron en más de una localidad, y los cuatro restantes fueron únicos (Figura 23).



**Figura 23.** Red de haplotipos para *Megalobulimus leucostoma leucostoma* basada en el marcador mitocondrial 16S rRNA. Las 40 secuencias analizadas están agrupadas en siete haplotipos. Los colores representan la proporción de individuos de las localidades: Huyro, Pavayoc, Santa María, Sambaray, Uchumayo, Huayanay, Echarate, Chaullay y Potrero. El haplotipo H2 es el de mayor frecuencia y ocupa posición central. La escala representa el número de secuencias. Cada línea representa una mutación de distancia entre las secuencias.

#### 5.4.1.5. Análisis de *mismatch distribution*

Otro método que nos permite evaluar la historia demográfica de una especie es el análisis de *mismatch distribution* (distribución de diferencias a pares entre las secuencias). La distribución de las diferencias a pares para los especímenes de *M. leucostoma leucostoma* corresponde a una curva unimodal, con un gran número de pares de secuencias que se diferencian entre sí por un reducido número de mutaciones (Figura 24). Esto es corroborado con el bajo valor de diversidad nucleotídica (0,00265).



**Figura 24.** Gráfica de distribución de diferencias a pares entre las secuencias de los individuos de *M. leucostoma leucostoma* en base al marcador mitocondrial 16S rRNA.

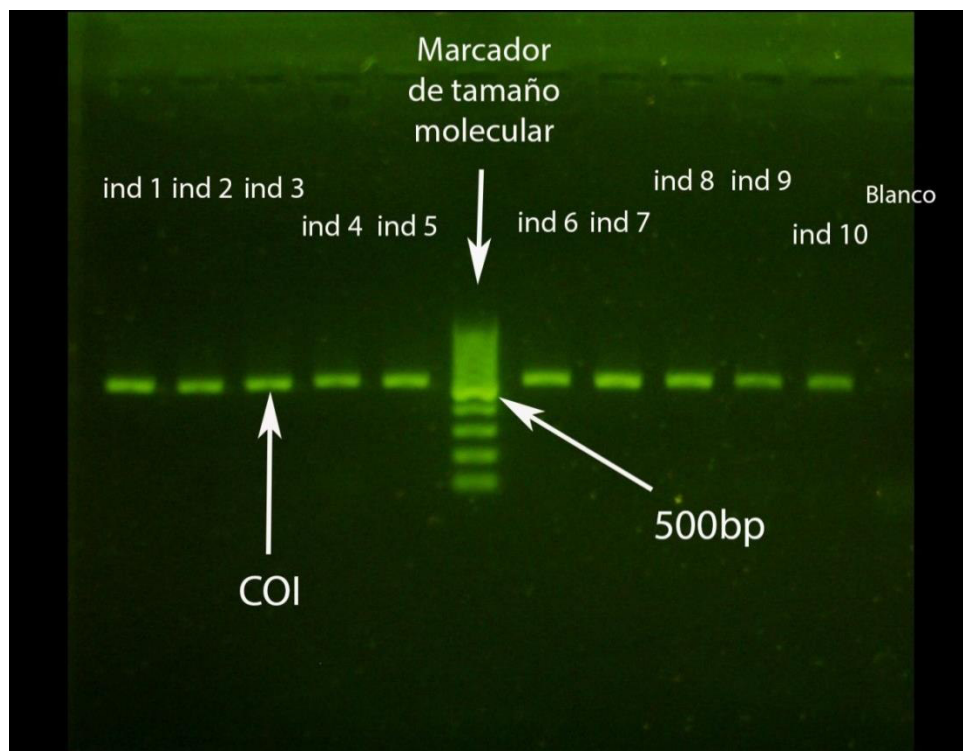
#### **5.4.1.6. Parámetros demográficos del DNA**

El valor obtenido para el estadístico  $F_s$  de  $F_u$  es -1,750. Para el caso del estadístico  $D$  de Tajima, es -0,68517. Para un marcador no codificante, valores negativos son indicadores de expansión poblacional, pero dada que su probabilidad es mayor a 0,1 son considerados valores no significativos. En resumen, ambos estadísticos no revelan un efecto significativo respecto a la dinámica de la población.

#### **5.4.2. Marcador mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI)**

##### **5.4.2.1. Descripción de las secuencias**

Se obtuvieron un total de 42 secuencias del marcador COI, de las cuales 30 son para *M. leucostoma leucostoma* procedentes de nueve localidades de Cusco (Tabla 2), cuatro para *M. florezi* procedentes de Sambaray, Pavayoc y Echarate, dos para *Megalobulimus* sp. 1 procedentes de Puno (San Gabán) y seis para *Megalobulimus* sp. 2. Las secuencias amplificadas mostraron un tamaño mayor a 700 pb (Figura 25). Destaca la similitud entre la composición de nucleótidos entre *M. leucostoma leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 1 respecto a la frecuencia de timinas; de igual manera ocurre entre *Megalobulimus* sp. 2 y *M. florezi*, con valores en el porcentaje de timinas cercanamente similares, pero con diferencias notables en otros nucleótidos (Tabla 14).



**Figura 25.** Gel de electroforesis de amplificados para el marcador COI de *M. leucostoma*, se observan carriles que muestran la presencia del marcador con un tamaño entre 700 y 800 pb.

**Tabla 14.** Promedios de la frecuencia de bases de las secuencias del marcador mitocondrial COI. T= Timina, C=Citosina, A=Adenina, G= Guanina, Tam (pb)= Tamaño en pares de bases, N= Número de secuencias.

Especie	T	C	A	G	Long	N
<i>M. leucostoma leucostoma</i>	37,8	17,1	25,1	19,9	706	30
<i>Megalobulimus</i> sp. 1	37,1	18,1	22,8	22,0	706	2
<i>Megalobulimus</i> sp. 2	39,4	17	23,7	20	706	6
<i>M. florezi</i>	39,0	16,0	24,2	20,8	706	4

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a un análisis de comparación haciendo uso de la herramienta BLAST del NCBI. En todos los casos se corroboró que las secuencias obtenidas fueron del marcador citocromo oxidasa I. De entre las secuencias depositadas en el GenBank, los cuatro taxas en estudio presentaron una mayor similitud con una secuencia perteneciente a *Megalobulimus oblongus* (Tabla 15), que a la fecha es una de las dos secuencias para el género *Megalobulimus*.

**Tabla 15.** Resultados de la comparación de dos secuencias de COI de los taxa en estudio con la herramienta nBLAST, en el GenBank. Se muestran los resultados con mayores valores obtenidos para cada uno de los taxa indicados.

Taxa	Mejor hit en nBLAST	Familia	Gen	#de accesión	Valor de E	% de identidad	% de cobertura
<i>M. leucostoma</i>	<i>Megalobulimus oblongus</i>	Strophocheilidae	COI	KJ546458.1	0,0	83%	100
<i>Megalobulimus</i> sp. 1	<i>Megalobulimus oblongus</i>	Strophocheilidae	COI	KJ546458.1	2E- 166	82%	100%
<i>Megalobulimus</i> sp. 2	<i>Megalobulimus oblongus</i>	Strophocheilidae	COI	KJ546458.1	9E- 180	83%	100%
<i>M. florezi</i>	<i>Megalobulimus oblongus</i>	Strophocheilidae	COI	KJ546458.1	0,0	85%	100

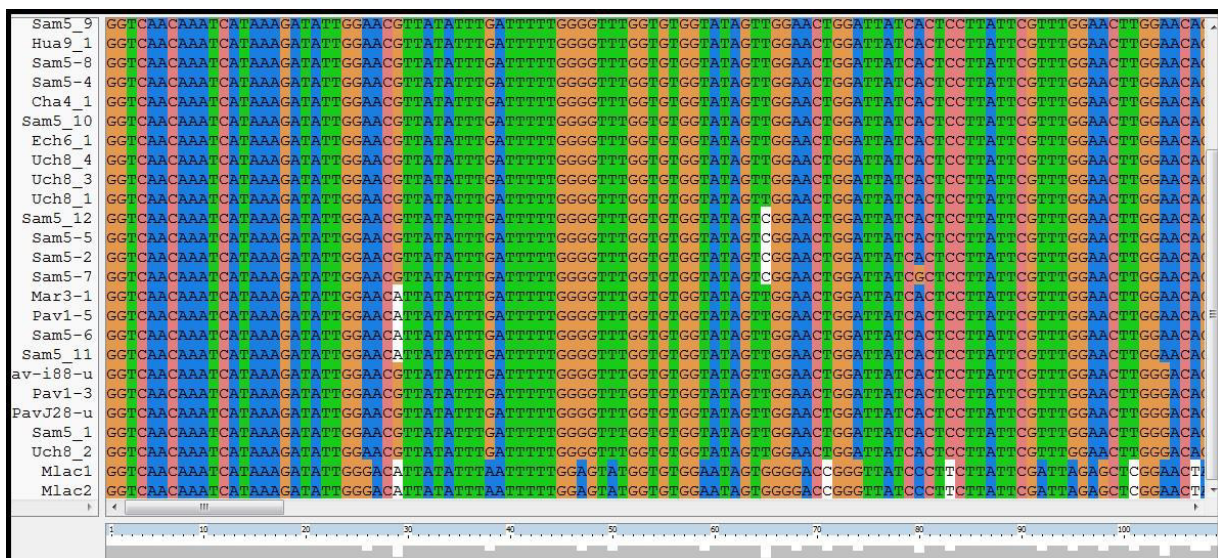
#### 5.4.2.2. Distancia genética entre especies de *Megalobulimus*

Con el objetivo de establecer la relación de similitud entre los taxa en estudio se realizó un alineamiento múltiple, seguido de un análisis de distancia genética entre especímenes de *M. leucostoma leucostoma*, *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *M. florezi*.

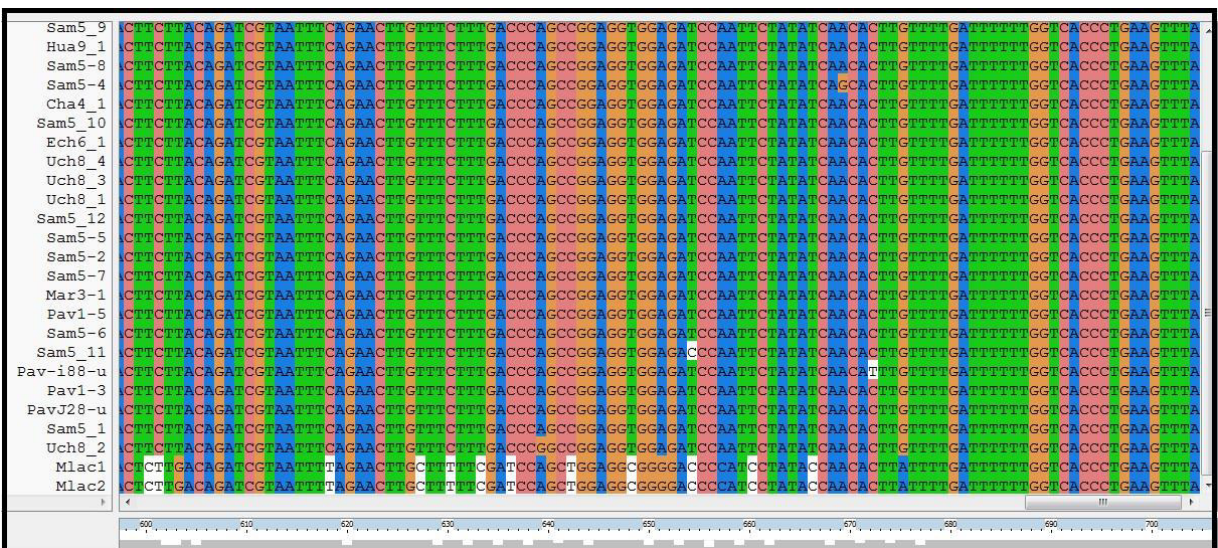
##### a. Alineamiento de secuencias múltiples

El alineamiento múltiple de secuencias del marcador COI tiene un tamaño de 706 sitios y no se observa la presencia de *indels* (inserción-delección). La primera región del alineamiento se mantiene conservada pues corresponde a la región de hibridación del *primer*. *M. leucostoma leucostoma* muestran una alta variabilidad entre sus secuencias pero se diferencian de *Megalobulimus* sp. 1 por transiciones y transversiones. Las dos secuencias de *Megalobulimus* sp. 1 muestran homogeneidad conformando un mismo haplotipo (Figura 26 y 27).





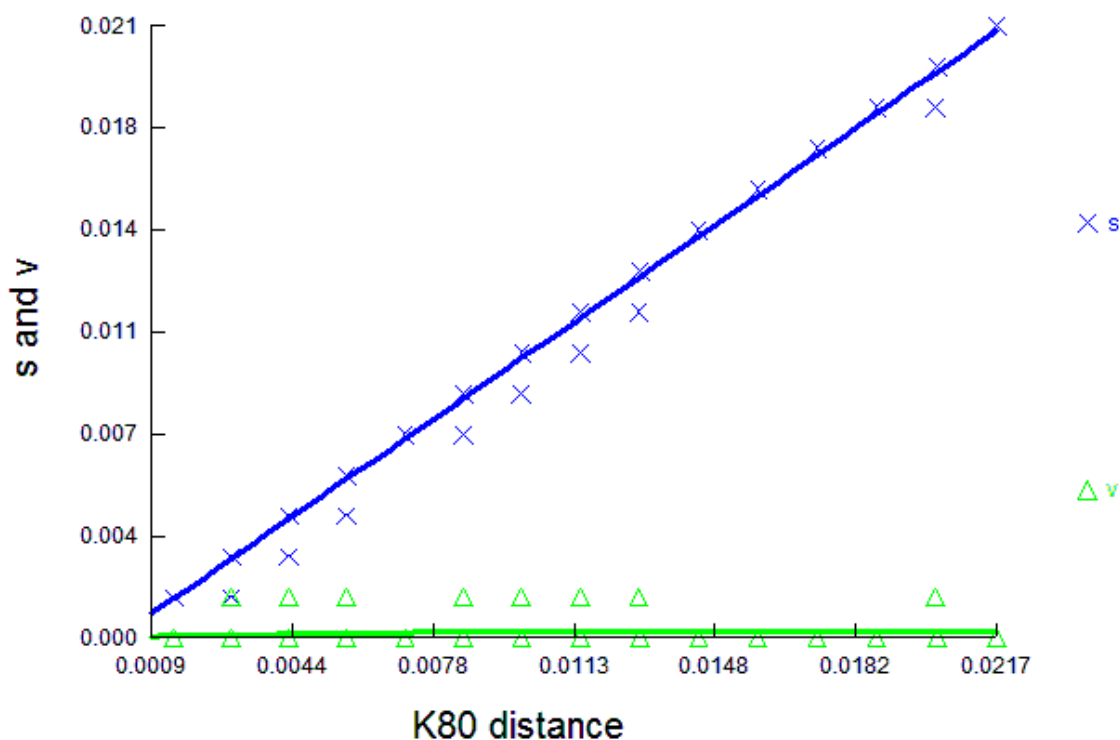
**Figura 26.** Región inicial del alineamiento múltiple de las secuencias del gen COI para los especímenes de *M. leucostoma leucostoma*, *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *M. florezi* en el programa Clustal x2. Se observan los primeros 120 nucleótidos.



**Figura 27.** Región terminal del alineamiento múltiple de las secuencias del gen COI para los especímenes de *M. leucostoma leucostoma*, *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *M. florezi* en el programa Clustal x2. Se observan los últimos 120 nucleótidos.

### b. Evaluación de la calidad de las secuencias

En el caso de las secuencias de *M. leucostoma leucostoma*, la gráfica de transiciones y transversiones *versus* las distancias corregidas Kimura 2 parámetros es lineal en el caso de las transiciones, la cual indica que no ha llegado a la saturación. En el caso de las transversiones, la curva se mantiene casi paralela al eje x lo cual indica que, sin importar la distancia que muestren los pares de secuencias, el número de transversiones se mantiene muy bajo (Figura 28).



**Figura 28.** Gráfica de transiciones (s) y transversiones (v) para el marcador mitocondrial COI de los individuos de *M. leucostoma leucostoma* comparadas contra la distancia corregida Kimura 2 parámetros (K80).

### c. Distancia genética

La distancia genética entre y dentro de las especies fue calculada con el programa Mega 5 (Tabla 16). La distancia genética observada entre los individuos de *M. leucostoma leucostoma* es realmente baja (0,01), mientras que para los dos individuos

de *Megalobulimus* sp.1 es 0,00 dado que las secuencias son idénticas. El mismo caso se presentó para *M. florezi*. En contraste, entre las seis secuencias de *Megalobulimus* sp. 2, existe una que presenta una mutación que la diferencia de las demás. Por otro lado, la distancia genética observada entre los taxa en estudio se mantuvo por encima del 20% (0,20).

**Tabla 16.** Distancia genética a pares corregida (Kimura 2 parámetros) basada en el marcador mitocondrial COI dentro y entre cada subespecie.

	<i>M. leucostoma leucostoma</i>	<i>Megalobulimus</i> sp. 1	<i>Megalobulimus</i> sp. 2	<i>Megalobulimus florezi</i>
<i>M. leucostoma leucostoma</i>	0,01	0,236	0,206	0,213
<i>Megalobulimus</i> sp. 1		0,00	0,271	0,263
<i>Megalobulimus</i> sp. 2			0,00	0,226
<i>M. florezi</i>				0,00

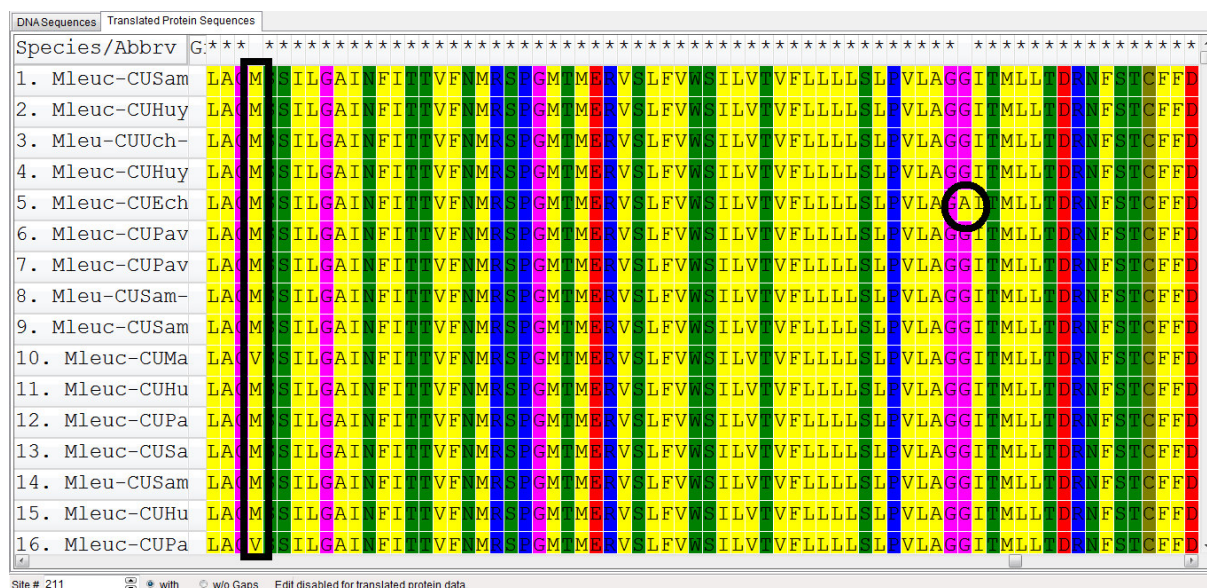
#### 5.4.2.3. Diversidad genética

Los cálculos de diversidad genética se llevaron a cabo sólo en especímenes de *M. leucostoma leucostoma* dado que *Megalobulimus* sp. 1 y *M. florezi* presentaron un solo haplotipo por taxa y *Megalobulimus* sp. 2 presentó dos haplotipos diferenciados por una posición.

El alineamiento de las secuencias de *M. leucostoma leucostoma* tiene un tamaño de 706 posiciones. Presenta 677 sitios invariables y 29 variables dentro de los cuales 20 son filogenéticamente informativos y nueve *singletons*. Al traducir las secuencias de nucleótidos, las secuencias aminoácidas resultantes fueron idénticas, excepto por dos posiciones, indicando que la mayoría de los cambios ocurridos en la secuencia nucleotídica corresponden a cambios sinónimos. Las mutaciones no sinónimas son sólo dos y se presentan en las posiciones 146 y 196 del alineamiento



de la secuencia traducida y corresponden a los cambios de aminoácidos de metionina a valina y de glicina a alanina, respectivamente (Figura 29).



**Figura 29.** Alineamiento de las secuencias traducidas para el marcador mitocondrial COI en *M. l. leucostoma*. Se observa similitud entre la gran mayoría de secuencias obtenidas, además el rectángulo y el círculo encierran los cambios en la secuencia aminoacídica Metionina-Valina y Glicina-Alanina, respectivamente.

Las 30 secuencias se agruparon en 15 haplotipos. La diversidad haplotípica es muy alta (0,936) mientras que la diversidad nucleotídica  $P_i$  es baja (0,00951) lo cual nos indica que a pesar de que tenemos 15 haplotipos dentro de las secuencias, las diferencias entre ellas están basadas en un escaso número de mutaciones.

Considerando las nueve localidades de procedencia, las localidades de Huyro y Echarate presentaron un solo haplotipo, H2 y H4 respectivamente, pero es importante resaltar que solo se tiene una secuencia de Echarate mientras que para Huyro existen seis. Las demás poblaciones dentro de cada localidad no mostraron estructuración geográfica, no habiendo ningún otro haplotipo único para alguna de las demás localidades (Tabla 17).

**Tabla 17.** Lista de especímenes de *M. leucostoma leucostoma* indicando procedencia, haplotipo (H) perteneciente y posiciones variables para el marcador mitocondrial COI. T= Timina, A=Adenina, G= Guanina, C=Citosina, (.) =nucleótido similar.

Individuo	Haplotipo	Posiciones variables													
		29	65	80	104	176	179	203	230	236	245	272	365	386	401
Sambaray-3	H1	G	T	A	A	C	C	A	C	T	C	T	A	A	C
Sambaray-9	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Huyro-1	H2	.	.	.	.	T	T	.	T	.	T	C	G	G	.
Huyro-3	H2	.	.	.	.	T	T	.	T	.	T	C	G	G	.
Huyro-5	H2	.	.	.	.	T	T	.	T	.	T	C	G	G	.
Huyro-7	H2	.	.	.	.	T	T	.	T	.	T	C	G	G	.
Huyro-8	H2	.	.	.	.	T	T	.	T	.	T	C	G	G	.
Huyro-10	H2	.	.	.	.	T	T	.	T	.	T	C	G	G	.
Uchumayo-1	H3	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	C	.	.	.
Uchumayo-3	H3	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	C	.	.	.
Uchumayo-4	H3	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	C	.	.	.
Echarate-1	H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Pavayoc-88u	H5	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.
Pavayoc-6	H6	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.
Pavayoc-3	H6	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.
Sambaray-1	H6	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.
Sambaray-8	H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Huayanay-1	H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Santa María-1	H8	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	T
Pavayoc-5	H8	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	T
Sambaray-6	H9	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.
Sambaray-11	H10	A	.	.	.	.	.	G	.	.	T	C	.	.	.
Chaulay-1	H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Sambaray-10	H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Sambaray-4	H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Uchumayo-2	H13	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.
Sambaray-2	H14	.	C	.	.	.	T	.	.	.	T	C	.	.	.
Sambaray-5	H14	.	C	.	.	.	T	.	.	.	T	C	.	.	.
Sambaray-12	H14	.	C	.	.	.	T	.	.	.	T	C	.	.	.
Sambaray-7	H15	.	C	G	.	.	T	.	.	C	T	C	.	.	.

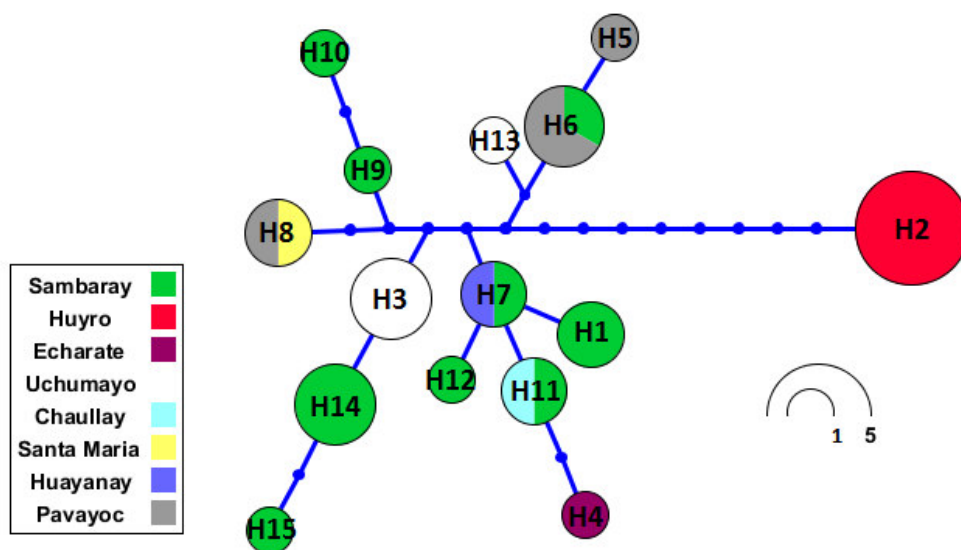
**Tabla 14.** (...)Continuación.

Individuo	Haplotipo	Posiciones variables														
		404	437	438	455	458	476	518	555	564	587	589	641	656	671	674
Sambaray-3	H1	G	A	A	A	G	A	C	T	T	G	G	A	T	A	C
Sambaray-9	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Huyro-1	H2	.	.	.	G	A	G	.	.	C	A	.	.	.	.	.
Huyro-3	H2	.	.	.	G	A	G	.	.	C	A	.	.	.	.	.
Huyro-5	H2	.	.	.	G	A	G	.	.	C	A	.	.	.	.	.
Huyro-7	H2	.	.	.	G	A	G	.	.	C	A	.	.	.	.	.
Huyro-8	H2	.	.	.	G	A	G	.	.	C	A	.	.	.	.	.
Huyro-10	H2	.	.	.	G	A	G	.	.	C	A	.	.	.	.	.
Uchumayo-1	H3	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Uchumayo-3	H3	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Uchumayo-4	H3	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Echarate-1	H4	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
Pavayoc-88u	H5	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	T
Pavayoc-6	H6	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
Pavayoc-3	H6	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
Sambaray-1	H6	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
Sambaray-8	H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Huayanay-1	H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Santa María-1	H8	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Pavayoc-5	H8	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Sambaray-6	H9	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.
Sambaray-11	H10	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	C	.	.
Chaulay-1	H11	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Sambaray-10	H11	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Sambaray-4	H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.
Uchumayo-2	H13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.
Sambaray-2	H14	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Sambaray-5	H14	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Sambaray-12	H14	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Sambaray-7	H15	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.

#### 5.4.2.4. Red de haplotipos

Para establecer los patrones demográficos y flujo génico se desarrolló una red de haplotipos para los 30 especímenes de *M. leucostoma leucostoma*, entre los que se presentaron 15 haplotipos. No se observa una topología definida dada la gran diversificación de las secuencias. Se podría definir la presencia de un haplogrupo y un haplotipo distante a este. Este haplotipo es el H2 presente en todos los individuos de

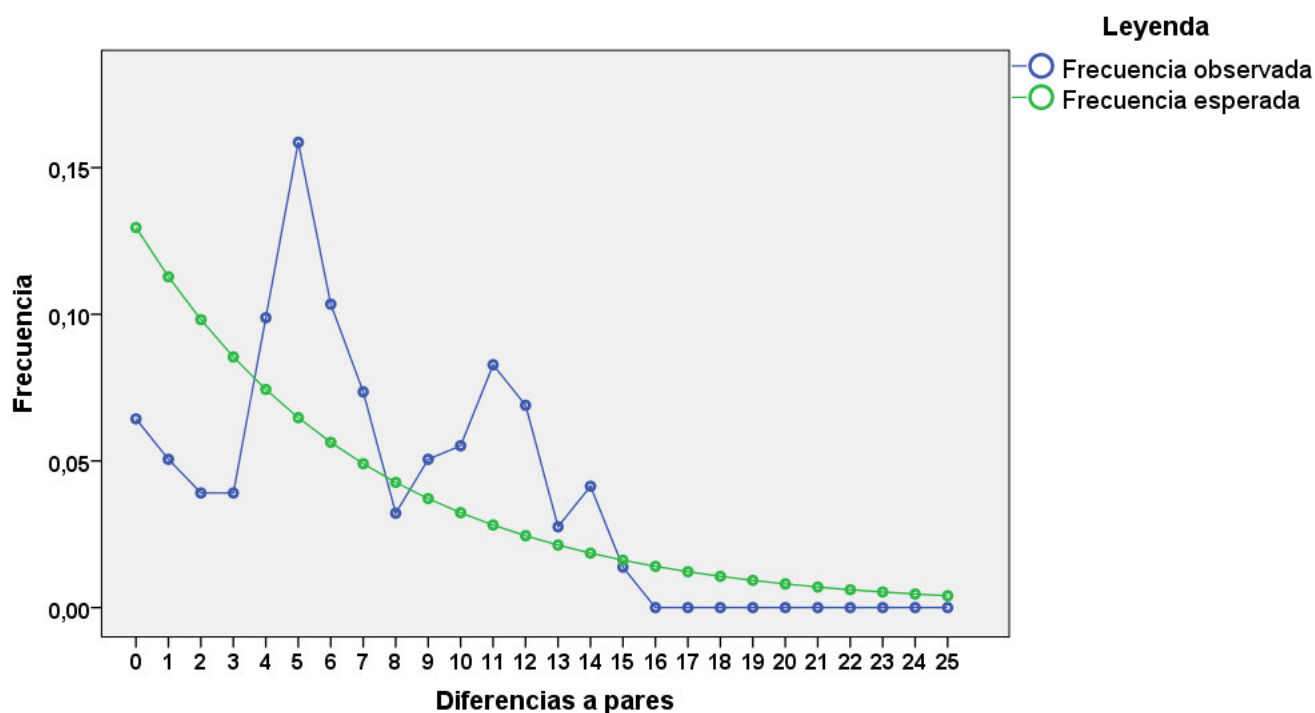
Huyro. Entre el haplotipo H2 y el haplogrupo, existe una distancia de nueve mutaciones, este último incluye individuos de todas las demás localidades. El haplogrupo no tiene una configuración específica mostrando que localidades separadas por ríos comparten haplotipos. Dentro de éste, son los haplotipos H3, H6 y H14 los más frecuentes, además es la localidad de Sambaray la que presenta el mayor número de haplotipos (Figura 30).



**Figura 30.** Red de haplotipos para *Megalobulimus leucostoma leucostoma* basada en el marcador mitocondrial COI. Se observan quince haplotipos que proceden de 30 secuencias. Los colores representan la proporción de individuos de las localidades: Huyro, Pavayoc, Santa María, Sambaray, Uchumayo, Huayanay, Echarate, Chaullay y Potrero. El haplotipo H2 es el de mayor frecuencia. La escala representa número de secuencias. Cada línea representa una mutación de distancia entre las secuencias.

#### 5.4.2.5. Análisis de *mismatch distribution*

El análisis de las frecuencias de las diferencias a pares (*mismatch distribution*) de las secuencias COI en *M. leucostoma leucostoma* fue realizado para las 30 secuencias. La distribución de las diferencias a pares para este marcador corresponde a una curva multimodal, lo que es evidencia de que provienen de una población ancestral de número efectivo grande. (Figura 31).



**Figura 31.** Gráfica de distribución de diferencias a pares entre las secuencias del marcador mitocondrial COI en *M. leucostoma leucostoma*.

#### 5.4.2.6. Parámetros demográficos del DNA

El valor obtenido para el parámetro estadístico  $F_s$  de  $F_u$  es -1,862. Un valor negativo indica una reciente expansión poblacional, aunque este resultado no es estadísticamente significativo dado que su probabilidad es mayor a 0,02 (0,069). Para el caso del estadístico  $D$  de Tajima, es -0,2968. Un valor negativo es indicador de

selección purificadora así como de expansión poblacional, pero dado que su probabilidad es mayor a 0,1 es considerado no significativo. En resumen ambos estadísticos no revelan un efecto significativo de la selección.

### **5.4.3. Marcadores concatenados**

#### **5.4.3.1. Diversidad genética**

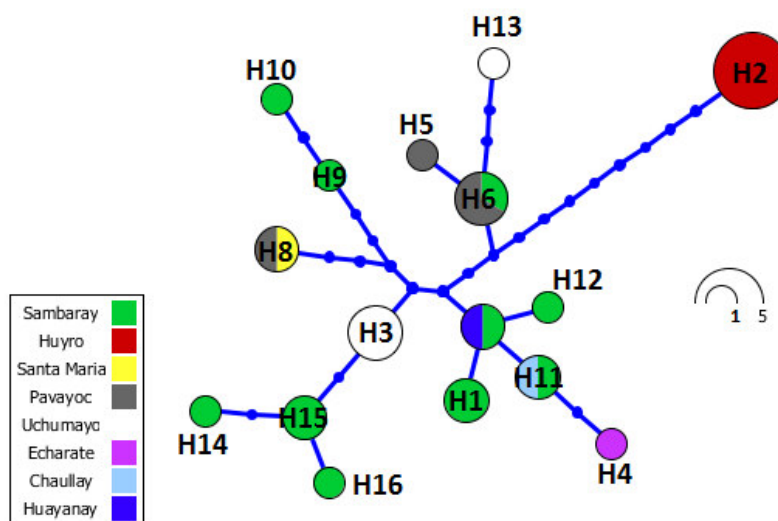
Los cálculos de diversidad genética para los marcadores concatenados se llevaron a cabo solo en especímenes de *M. leucostoma leucostoma*. Dentro de esta subespecie solo se consideraron 30 individuos, ya que en solo éstos se logró la amplificación del COI.

El alineamiento de las secuencias de *M. leucostoma leucostoma* tiene un tamaño de 1300 posiciones. Presenta 995 sitios invariables y 34 variables dentro de los cuales 24 son filogenéticamente informativos y 10 *singletons*. Las secuencias se agruparon en 16 haplotipos. La diversidad haplotípica es muy alta (0,940) mientras que el valor Pi de la diversidad nucleotídica es bajo (0,00740), lo cual nos indica que a pesar de que tenemos 16 haplotipos dentro de las secuencias, las diferencias entre ellas están basadas en un escaso número de mutaciones.

Considerando las nueve localidades de procedencia, la localidad de Huyro presentó un solo haplotipo (H2), lo cual es reflejo de lo observado analizando los marcadores independientemente. Las demás poblaciones dentro de cada localidad no mostraron una estructuración geográfica, no habiendo ningún otro haplotipo único para alguna de las demás localidades.

#### 5.4.3.2. Red de haplotipos

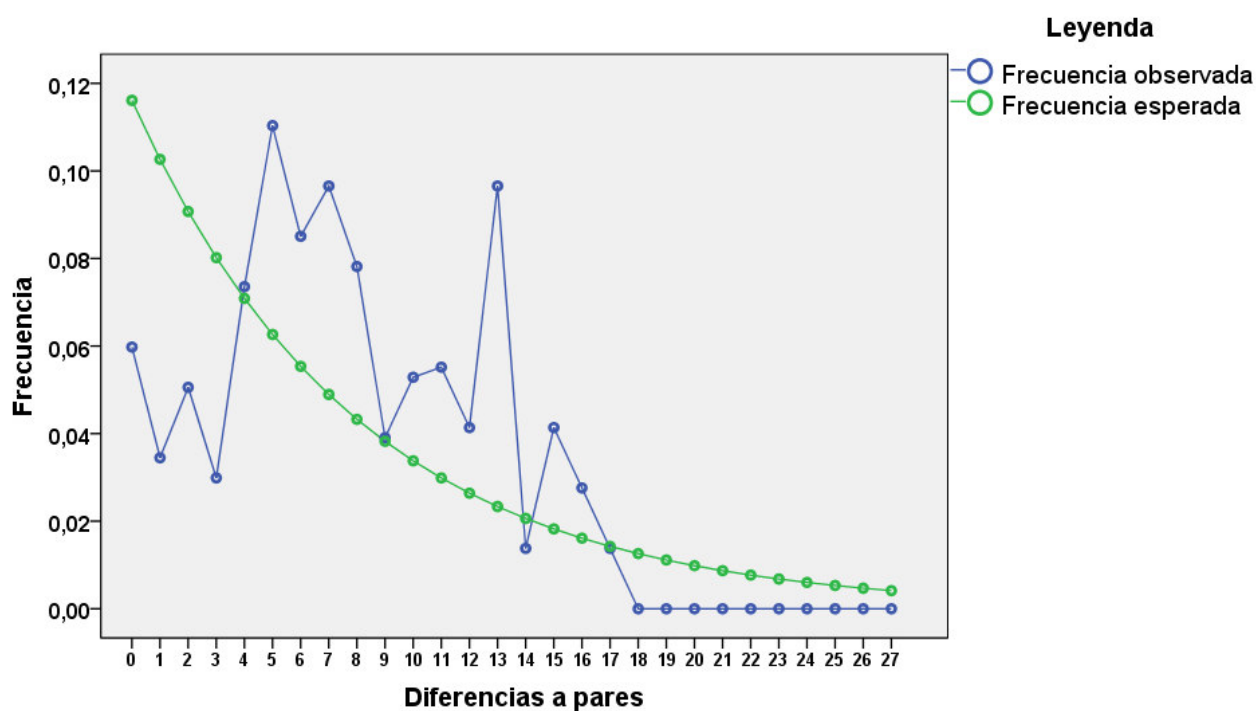
Para establecer los patrones demográficos y flujo génico se desarrolló una red de haplotipos para los 30 especímenes de *M. leucostoma leucostoma* que fueron agrupados en 16 haplotipos. No se observa una topología definida dada la gran diversificación de las secuencias. Se observa la presencia de un haplogrupo y un haplotipo distante a éste. Dicho haplotipo es el H2 presente en todos los individuos de Huyro, localidad ubicada a mayor altitud. Entre el haplotipo H2 y el haplogrupo, existe una distancia de 10 mutaciones. El haplogrupo no tiene una configuración específica y presenta todas las localidades, excepto Huyro, dentro de las cuales algunas comparten haplotipos a pesar de estar separadas por ríos. Dentro de éste, son los haplotipos H3 y H6 los más frecuentes, ambos con tres individuos cada uno y es la localidad de Sambaray la que presenta el mayor número de haplotipos (Figura 30).



**Figura 32.** Red de haplotipos para *Megalobulimus leucostoma leucostoma* basada en los marcadores concatenados 16S rRNA y COI a partir de 30 individuos. Los colores representan localidades: Huyro, Pavayoc, Santa María, Sambaray, Uchumayo, Huayanay, Echarate y Chaullay. Las líneas entre los puntos indican una mutación de distancia.

#### 5.4.3.3. Análisis de *mismatch distribution*

La topología observada en la red de haplotipos presenta una gran diversificación de los haplotipos lo cual puede ser corroborado con el análisis de *mismatch distribution* (distribución de diferencias a pares entre las secuencias). La distribución de las diferencias a pares para los especímenes de *M. leucostoma leucostoma* corresponde a una curva multimodal, lo que representa una población en equilibrio. Esto ocurre cuando existen diferencias entre pares de secuencias que son variables debido al flujo génico entre los individuos (Figura 33).



**Figura 33.** Gráfica de distribución de diferencias a pares entre las secuencias para los individuos de *M. leucostoma leucostoma* en base a los marcadores concatenados.

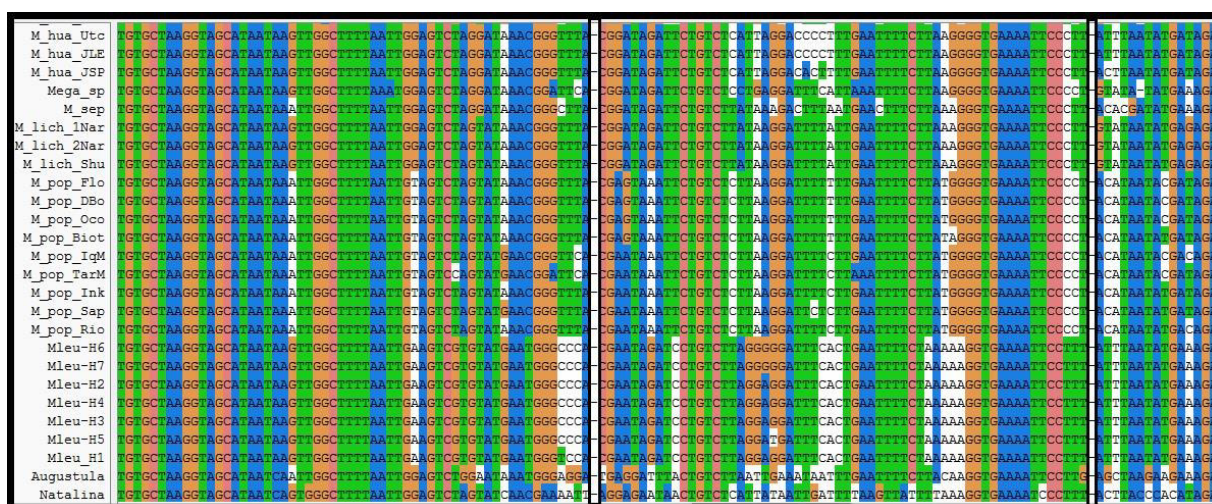


## 5.5. Evaluación filogenética

Con el objetivo de determinar la posición evolutiva de las especies de *Megalobulimus* aquí estudiadas se emplearon dos metodologías para la obtención de árboles filogenéticos, Máxima Verosimilitud e inferencia bayesiana. Dicho análisis se realizó en base al marcador 16S rRNA debido a que es el único marcador disponible en el GenBank para otras especies de *Megalobulimus*. Se usaron tres especies como grupos externos (Tabla 1).

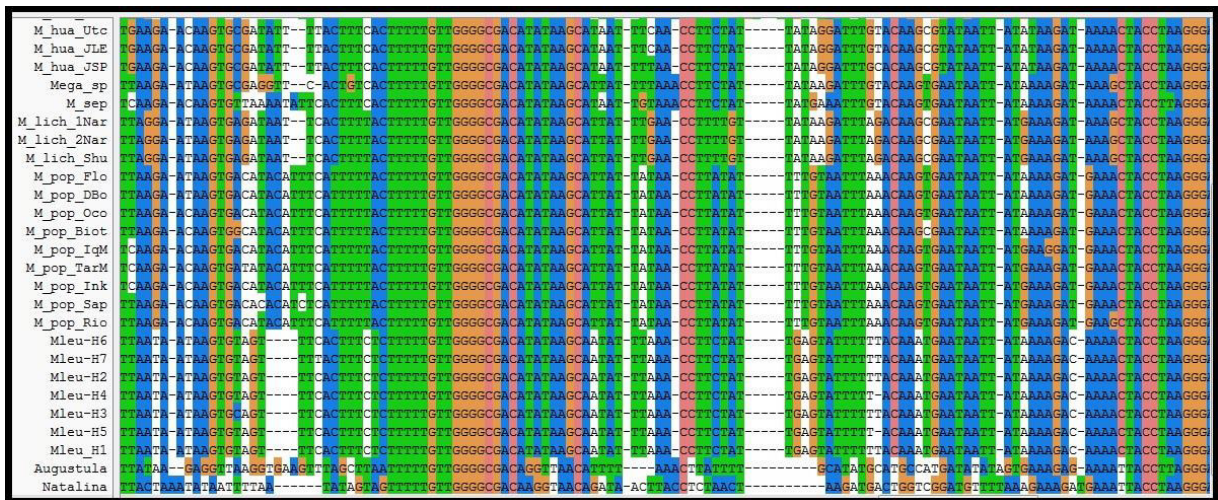
### 5.5.1. Alineamiento:

El alineamiento de 42 secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA tiene un tamaño de 362 sitios. Se observa la presencia de numerosos *indels* (inserción-delección). La primera región del alineamiento (Figura 34) se mantiene conservada pues corresponde a la región de hibridación del *primer forward*. Los dos primeros *gaps* son producidos por *Edentulina*, la cual corresponde a uno de los cuatro grupos externos seleccionados. Las secuencias de *M. leucostoma leucostoma* mantienen su identidad frente a las demás secuencias de *Megalobulimus*. Mientras que *M. florezi* presenta la misma secuencia que *M. capillaceus*.



**Figura 34.** Primeros 120 nucleótidos del alineamiento de 39 secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA de individuos del género *Megalobulimus* y tres especies empleadas como grupos externos.

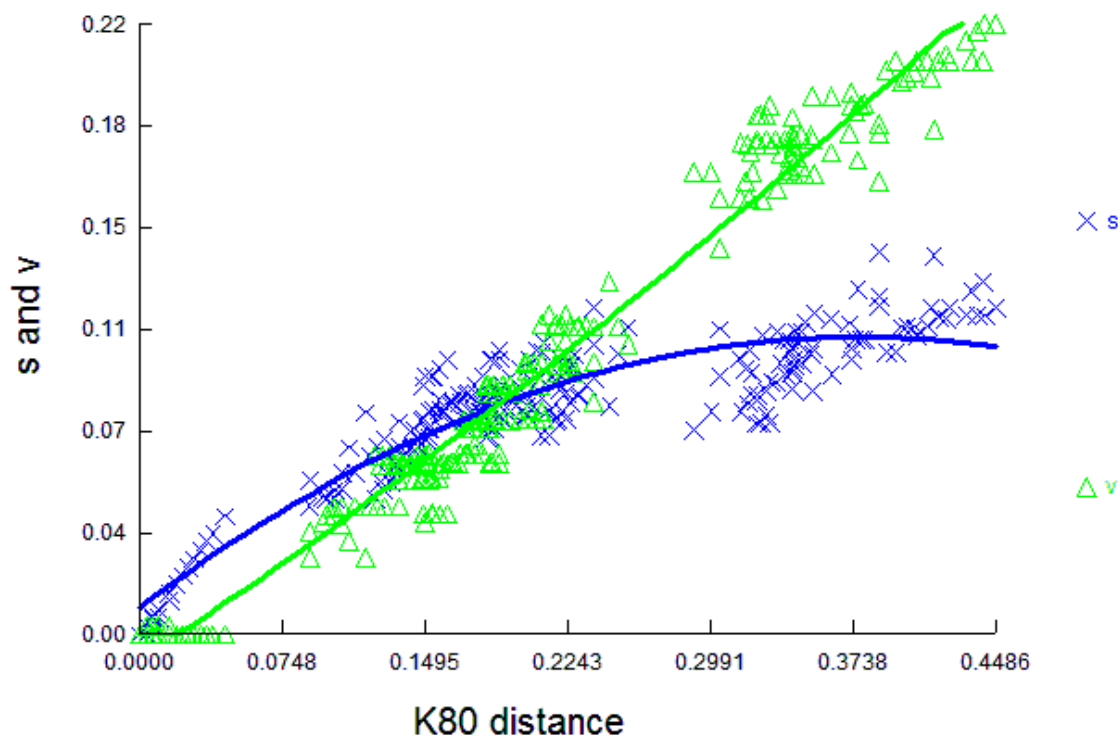
La región con mayor número de *gaps* corresponde a los 120 últimos nucleótidos (Figura 35), en donde se observa un *gap* producido por el alineamiento de las secuencias de *M. popelairianus* y *M. leucostoma*, así como otro *gap* en las secuencias de *M. lichtensteini* y *M. huascari*; tales *gaps* se encuentran entre los sitios 180 y 190. Por último, el *gap* de mayor tamaño se presenta entre las posiciones 240 y 250 y se produce por el alineamiento de *M. florezi*, *M. capillaceus*, *M. maximus* y *Megalobulimus* sp. 1.



**Figura 35.** Últimos 120 nucleótidos del alineamiento de 34 secuencias de individuos del género *Megalobulimus* y cuatro especies empleadas como grupos externos para el marcador mitocondrial 16S rRNA.

### 5.5.2. Grado de saturación de las secuencias

Mediante el programa DAMBE se evaluó el grado de saturación de las secuencias (Figura 36). Las transversiones muestran un carácter lineal mientras que las transiciones muestran una tendencia a la saturación ya que se observa que la curva forma una “meseta”.



**Figura 36.** Transiciones y transversiones comparadas contra las distancias a pares entre las secuencias 16S rRNA de *Megalobulimus* y tres grupos externos. s= transiciones, v = transversiones. El modelo de sustitución nucleotídica para corrección de la distancia fue Kimura 2 parámetros (K80).

### 5.5.3. Análisis filogenético

El modelo de sustitución seleccionado empleando el criterio de información de Akaike (AIC=valor 4992.1943) en el programa jModeltest fue el GTR + I + G. Este modelo asume 6 tasas diferentes de sustitución. El parámetro I indica la proporción de sitios invariables dentro de las secuencias y cuyo valor obtenido fue 0,392. El parámetro G (parámetro  $\alpha$  de la distribución gamma) indica el grado de variación de la tasa de sustitución nucleotídica a lo largo de la secuencia y cuyo valor obtenido fue 0,76.

El árbol obtenido con el método filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) (Figura 37) muestra que dentro de *Megalobulimus* existen dos clados, de los cuales solo uno presenta un alto soporte de *bootstrap*. Para permitir un mejor análisis, estos

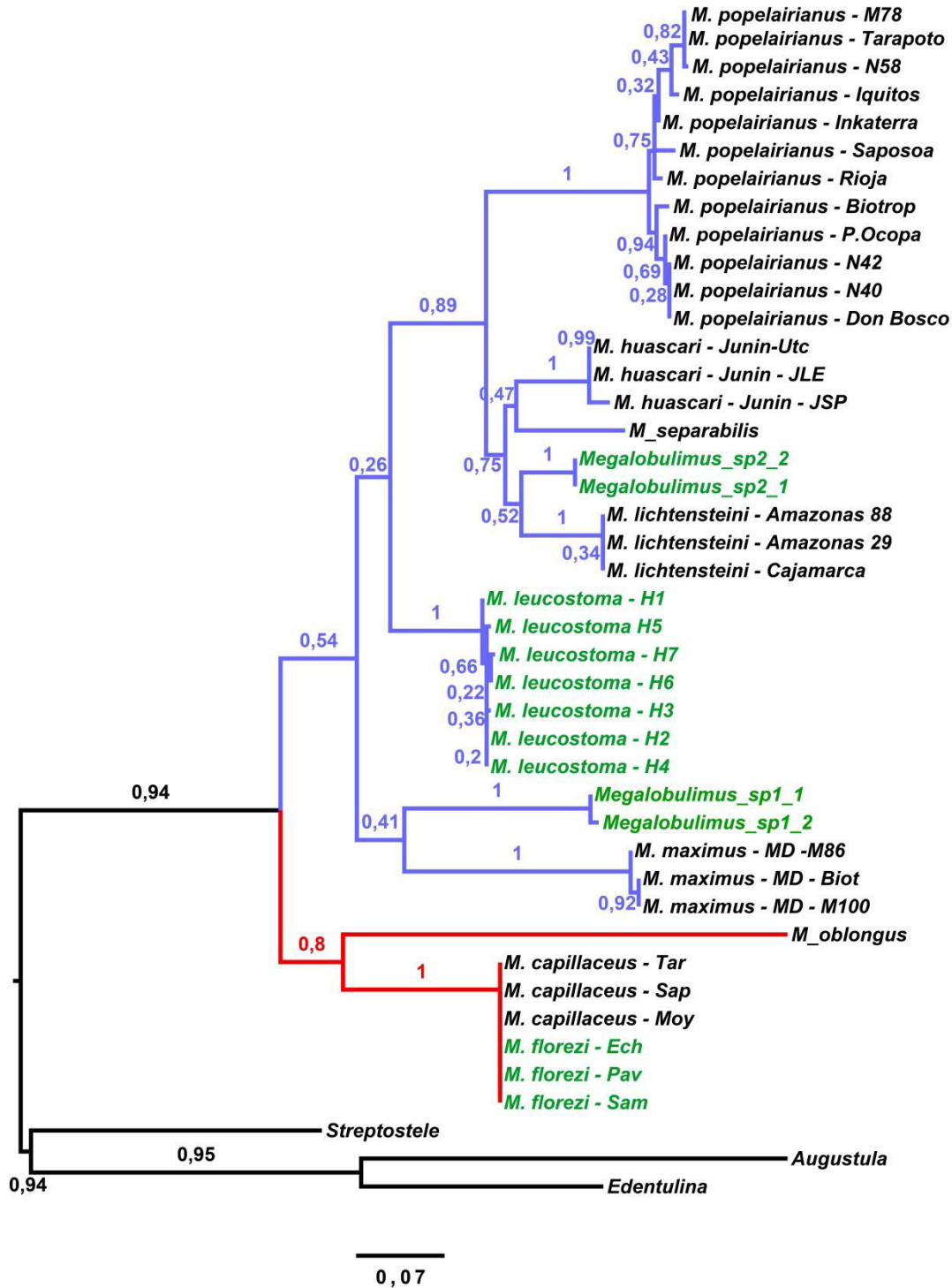
clados se denominarán clado A y B de manera arbitraria. El clado A, con mayor soporte, incluye a tres especies de *Megalobulimus* con peristoma rojo, *M. capillaceus*, *M. florezi* y *M. oblongus*. *Megalobulimus capillaceus* y *M. florezi* conforman un clado debido a que presentan la misma secuencia para el marcador. *Megalobulimus oblongus* se presenta como grupo hermano del clado *M. capillaceus* – *M. florezi*. El clado B presenta bajo soporte de *bootstrap* (0,541). Este clado agrupa a cinco especies y tres de los taxa en estudio. Este clado presenta dos grupos monofiléticos con bajo soporte de *bootstrap*, el primero compuesto por *Megalobulimus maximus* procedente de Madre de Dios y a *Megalobulimus* sp. 1 de Puno. El segundo grupo monofilético lo conforman dos clados, el primero incluye a los individuos de *Megalobulimus leucostoma* y el segundo, el cual presenta un alto soporte de *bootstrap* (0,893), presenta dos grupos monofiléticos. De los dos grupos, el primero incluye a todos los individuos de *Megalobulimus popelairianus* mientras que el segundo muestra las relaciones entre *M. huascari*, *M. separabilis*, *Megalobulimus* sp. 2 y *M. lichtensteini*, donde estos últimos dos taxa conforman un grupo monofilético aunque con bajo soporte de *bootstrap*. Es importante notar que en el clado B existe una tendencia, los clados más derivados presentan una distribución geográfica más al norte que los clados basales correspondientes, con excepción del clado *M. popelairianus* donde ya los individuos se encuentran mezclados en relación a su procedencia.

El árbol filogenético obtenido por el método de Inferencia Bayesiana (IB) (Figura 38) presenta un arreglo muy similar al árbol de ML, presentando el clado A y B. El clado A incluye a los grupos *M. capillaceus*-*M. florezi* y *M. oblongus*. El clado B, el cual presenta bajo valor de probabilidad posterior, incluye a las mismas especies en el clado correspondiente en el árbol de ML, sin embargo la distribución de los taxa en el árbol varía. Dentro de este clado, es *Megalobulimus* sp. 1 el que se muestra basal a todos los demás, siendo el grupo hermano de un clado con alto valor de probabilidad posterior (0,843), el cual incluye una politomía conformada por *M. maximus*, *M. leucostoma* y un grupo monofilético conformado por *M. popelairianus*, *M. lichtensteini*, *M. separabilis*, *M. huascari* y *Megalobulimus* sp. 2. En este árbol, *Megalobulimus* sp. 2 conforma un grupo monofilético con *M. huascari* y *M. separabilis* con un alto valor de

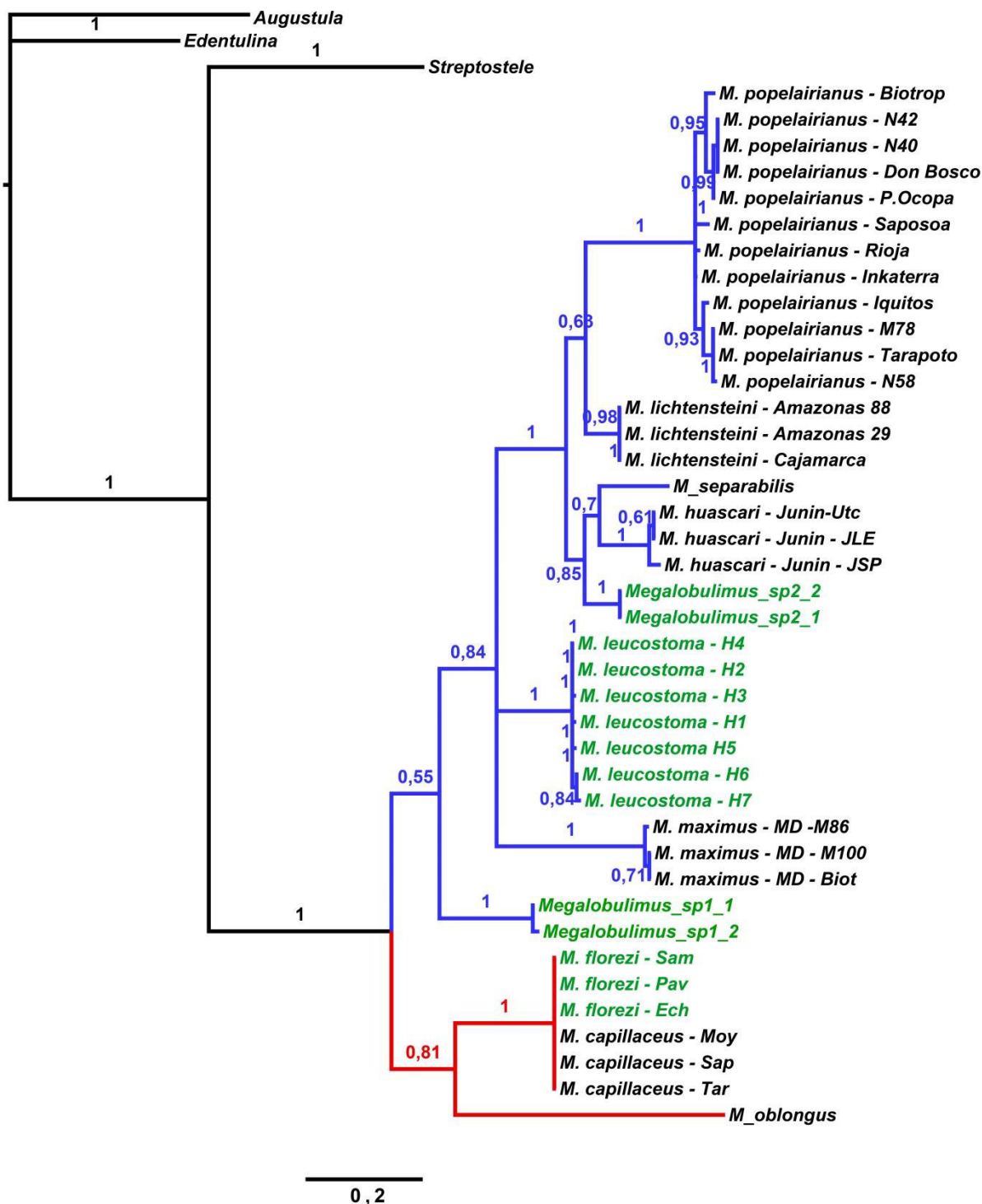
probabilidad posterior (0,999). Aquí también se podría inferir la misma tendencia observada en el árbol de ML con respecto al clado B, en donde los clados más basales habitan en latitudes más al sur con respecto a los clados más derivados con excepción de *M. popelairianus*.

En relación a las secuencias de los cuatro taxa en estudio, *M. leucostoma leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 1 presentaron haplotipos no compartidos con otros taxa y formaron grupos monofiléticos independientes, aunque éstos sin apoyo estadístico, pero con una distancia genética que sugiere que *Megalobulimus* sp.1 no estaría en relación a la subespecie *lacunosus*. *Megalobulimus* sp. 2, a pesar de presentar similitudes en la genitalia y concha con la subespecie *leucostoma*, se ubica dentro de un grupo distante como es el clado de *M. separabilis*, una especie endémica de los andes centrales del Perú.





**Figura 37.** Árbol filogenético de ML empleando el marcador 16S rRNA para 11 especies de *Megalobulimus*. El clado A está indicado con las ramas rojas y el clado B con las ramas azules. Los taxa en estudio están indicados con coloración verde. Se muestra el soporte de *bootstrap* en los nodos. La escala representa distancias genéticas en sustituciones de nucleótidos por sitio.



**Figura 38.** Árbol filogenético de IB empleando el marcador 16S rRNA para 11 especies de *Megalobulimus*. El clado A está indicado con las ramas rojas y el clado B con las ramas azules. Los taxa en estudio están indicados con coloración verde. El número junto a los nodos indica la probabilidad posterior para el análisis bayesiano. La escala representa distancias genéticas en sustituciones de nucleótidos por sitio.

## 6. DISCUSIÓN

Uno de los mayores retos dentro de las ciencias biológicas es lograr una correcta discriminación de las especies, una delimitación que pueda ayudar a entender mejor los patrones y procesos involucrados en la diversificación de éstas. La presente tesis ha tenido como objetivo evidenciar dos tipos de patrones: morfológicos y genéticos. Patrones morfológicos que puedan servir para la correcta delimitación entre algunas especies de caracoles terrestres del género *Megalobulimus* en el sur de la vertiente oriental de los Andes del Perú. Asimismo, se buscó determinar los patrones de diversidad genética basadas en marcadores moleculares mitocondriales en estas especies para entender cómo las características del entorno, así como algunas estrategias reproductivas pueden influenciar en su diversificación. Estas dos propuestas se hacen necesarias para la delimitación y eventual identificación de especies ya que este tópico no es un interés exclusivo para los taxónomos sino también para otras ramas como biogeografía, ecología y conservación (Pfenninger *et al.*, 2006).

El presente estudio involucró cuatro taxa del género *Megalobulimus* cuya distribución está en relación a los Andes, *Megalobulimus leucostoma leucostoma*, *M. florezi*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2. Sobre las especies de *Megalobulimus* descritas para el área de estudio se presenta una larga lista de sinonimias que conforman una parte importante de la problemática sobre la identidad de las especies en el área de estudio. Entre éstas destacan *Megalobulimus leucostoma* y las subespecies que la componen, cuya descripción solo se basó en algunas características de la concha. Los análisis realizados sustentan que los taxa en estudio tienen diferentes patrones demográficos, además de distintos patrones morfológicos a nivel de la conchilla y el sistema reproductor, los cuales se discutirán a continuación.



### **6.1. Conquiología y Morfometría, implicancia en la taxonomía de *Megalobulimus***

Mientras que las relaciones evolutivas dentro del clado Stylommatophora, basadas en los marcadores moleculares nucleares ITS2-28S rRNA, se han resuelto diferenciándose tres clados, Achatinoideos, No-Achatinoideos y Scolodontidae (Ramírez *et al.*, 2011), las relaciones entre las familias que las componen no se encuentran bien esclarecidas. La dificultad de agrupar a las familias dentro de Stylommatophora comienza desde que la taxonomía de este grupo, y de gran parte de moluscos, aún mantiene a los caracteres conquiológicos como prioritarios a la hora de la determinación de especies (Köhler y Johnson, 2012). Además, se debe a las diferentes interpretaciones en los diferentes caminos del cambio evolutivo de los caracteres conquiológicos y anatómicos (Nordsieck, 1985; Haszprunar y Huber, 1990; Nordsieck, 1990; Salvini-Plawén y Steiner, 1996). Todo esto ha provocado que muchas familias del clado Stylommatophora, tal como la Familia Strophocheilidae, tengan una taxonomía y nomenclatura confusa e incluso inestable. El problema que implica considerar los caracteres conquiológicos para la designación de especies es la gran variabilidad que puede presentar la concha. El caso de las especies del género *Megalobulimus* encaja dentro de esta problemática.

El análisis de algunas especies de este género nos ha permitido comprender que el problema taxonómico puede observarse a dos niveles, el primero en el reconocimiento de los individuos a partir de la concha, que es el problema más común, y un segundo que involucra la sinonimia relacionada a una especie. Cada especie de *Megalobulimus* descrita hasta 1948, fecha en la cual Bequaert (1948) presenta una revisión de toda la Familia Strophocheilidae, presenta al menos un nombre sinónimo. Debido a esto es preciso entender que la revisión del estatus taxonómico de las especies requiere de una revisión de ejemplares tipo, además de material con partes blandas.

El caso particular de *M. florezi* es el mejor ejemplo; inicialmente fue identificada como una población de *M. capillaceus* debido a sus similitudes conchológicas con esta especie, mas no al total de características anatómicas con las cuales, luego de un detallado análisis de la concha y de la parte blanda de las poblaciones de Cuzco, Borda y Ramírez (2013) demostraron que correspondía a una nueva especie denominándola *M. florezi*.

Dos subespecies del grupo *M. leucostoma*, *M. l. leucostoma* y *M. l. lacunosus*, presentan un panorama complicado en su discriminación. El análisis de las características de la concha de estas subespecies puede discriminarlas como especies diferentes. La revisión de los ejemplares tipo depositados en el NHMUK para *Helix mathiusii* y *Helix lacunosus*, ambas sinonimias para *M. l. leucostoma* y *M. l. lacunosus*, respectivamente, deja en claro que no podrían ser consideradas la misma especie dadas las diferencias en tamaño de la espira y el largo de la concha. Los individuos de *Megalobulimus* sp. 1, colectados en la provincia de Carabaya, esta localidad fue reportada para *M. l. lacunosus* por lo cual se buscó determinar si estos individuos corresponden a esta subespecie. Sin embargo, se diferencian del ejemplar tipo de *M. l. lacunosus* por presentar mayores proporciones en la altura de la apertura, de espira y una vuelta corporal más ancha, además que el análisis geométrico demostró que ambos taxa presentan formas muy diferenciadas (Figura 12).

El análisis de componentes principales a partir de las variables de distancia de la concha de los individuos colectados junto con los especímenes tipo, da soporte a la observación de considerar especies distintas a *M. l. lacunosus* y a *M. l. leucostoma*; además de considerar a *Megalobulimus* sp. 1 como una entidad independiente al complejo *Megalobulimus leucostoma*. Sin embargo, Dentro del análisis geométrico, se observa que, tanto *M. l. lacunosus* y *Megalobulimus* sp. 1, aunque son independientes entre si, están incluidos dentro del morfoespacio de *M. l. leucostoma*. Esto se debe a que el análisis geométrico es más eficiente en el manejo de la información de la forma del organismo (Rohlf y Slice, 1990; Rohlf y Marcus, 1993), entonces si consideramos únicamente las formas de la concha observaremos que existen conchas de *M. l.*

*leucostoma* que son similares a *Megalobulimus* sp. 1 y *M. l. lacunosus*. Sin embargo, estas dos últimas son mucho más grandes y tienen características de ornamentación diferenciada.

El panorama para *Megalobulimus leucostoma weyrauchi* inicialmente resultaba incierto. La descripción de esta subespecie se dio en 1949 por Bequaert a partir de individuos procedentes del departamento de Cusco, sin una localidad exacta. Bequaert (1949) describe esta subespecie con proporciones menores a la del típico *Megalobulimus leucostoma*, pero los paratipos para la subespecie *M. l. weyrauchi* presentan dimensiones ligeramente mayores a su holotipo correspondiente. El análisis de componentes principales para variables de distancia y de forma, que incluye medidas del holotipo y cuatro paratipos de *M. l. weyrauchi*, ubica a estos individuos muy cerca del morfoespacio de los individuos de *M. l. leucostoma* colectados en Cusco en el presente estudio. El amplio rango de formas y proporciones que muestra el morfoespacio de *M. l. leucostoma* (Figura 11 y 12) es la razón por la cual el límite entre las subespecie *M. l. leucostoma* y *M. l. weyrauchi* resulte indiscriminable.

El concepto de subespecie indica que una subespecie o raza geográfica es una variedad de la población original que no mantiene simpatría (Wilson y Brown, 1953; Mayr, 1982). Las conchas analizadas del morfotipo *M. l. weyrauchi* claramente corresponden a ejemplares pequeños de *M. l. leucostoma* colectados en simpatría. Por lo tanto, las similitudes entre las medidas y la forma de la concha y distribución simpátrica son clara evidencia de nulo soporte a la designación de *M. l. weyrauchi* como subespecie por lo que debería ser considerada una sinonimia de *M. l. leucostoma*, y no como una subespecie independiente.

Dentro del morfoespacio de *M. l. leucostoma* obtenido en el análisis morfométrico clásico y geométrico se observa que los individuos denominados *Megalobulimus anae* claramente encajan dentro, además basado en la coloración y forma es muy similar a esta especie. Según datos de las etiquetas de colección del Museo de Historia Natural de la UNMSM, así como del Florida Museum of Natural

History, esta especie inicialmente fue denominada *Thaumastus anae*, y quizá más adelante, al observar que sus características no eran compatibles con el género *Thaumastus* se le cambió la denominación por *Megalobulimus*, la cual figura también en ambas etiquetas. Estas muestras fueron colectadas en Quillabamba, Cusco. En una revisión de la monografía de Bequaert (1948) sobre los Strophocheilidae, no se encuentra ningún registro de alguna especie cuyo nombre específico sea “*anae*”. Por último, dentro de la lista de nombres de taxa designados por Pilsbry y revisados por Clench y Turner (1962), no existe mención de esta especie. Al no contar con una descripción original es que este taxón resulta inválido y además, dadas las similitudes en la concha y distribución entre *M. anae* y *M. leucostoma leucostoma*, es que se concluye que son individuos de esta última, pero mal identificados.

## **6.2. Efecto de la variabilidad morfológica en la determinación de especies:**

La anatomía interna de las especies de *Megalobulimus* presenta una particularidad, las características de los órganos presentan una gran homogeneidad (Leme, 1973). Las diferencias observadas dentro de estos órganos respecto a tamaño no deberían ser consideradas, puesto que en moluscos terrestres está demostrado que el tipo de fijación para los especímenes influye grandemente en los tamaños de los órganos, principalmente en aquellos de naturaleza muscular (Martins, 1991). Escasas son las características anatómicas que permiten discriminar especies, pero es importante resaltar que los órganos sexuales masculinos y femeninos han dado una buena resolución a la hora de ayudar a diferenciar especies.

Los patrones de distribución de los pliegues de la superficie interna del pene observados en *M. l. leucostoma* presentan gran homogeneidad, la distribución de los pliegues observada en el tercio proximal del pene se mantiene constante en 10 individuos procedentes de diferentes localidades incluso separadas por ríos. Además, cabe destacar que *Megalobulimus* sp. 2, procedente de Huancavelica, presenta un patrón muy similar al de *M. l. leucostoma*. Este patrón difiere grandemente del

observado en *Megalobulimus* sp. 1, la que no sólo se diferencia por el patrón de pliegues sino también por la forma del pene (forma de botella). Sin embargo, las características de forma del pene también podrían no ser informativas dado que en la muestra de individuos de *Megalobulimus* sp. 2 se ha podido observar una gama de diferentes formas, desde penes con forma tubular hasta penes con una forma invertida a la de *Megalobulimus* sp. 1. Los motivos de esta variabilidad son diversos, desde el método de preservación de las muestras hasta el estadio de madurez sexual del individuo. Aun cuando *Megalobulimus* sp. 2 y *M. l. leucostoma* comparten el mismo patrón en la distribución de los pliegues de la superficie interna del pene, se observan diferencias en el patrón de pliegues de la superficie interna de la vagina y en el tamaño del divertículo del oviducto libre.

Hollander *et al.* (2013) indicaron que se espera un patrón de gran divergencia en características reproductivas entre especies hermanas con rangos de distribución superpuestos (simpatría) y todo lo contrario entre especies hermanas con distribución alopatrica, fortaleciendo así el proceso de especiación. Esta similitud entre los patrones peneales entre *M. l. leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 2 podría ser el resultado de un carácter presente en el ancestro más cercano para estas especies y que ahora se observa en ambos o como una homoplasia, producto de la convergencia evolutiva. Además, es importante resaltar la presencia de los pliegues transversales en la superficie interna del pene dado que es una característica que no ha sido mencionada en otras especies de *Megalobulimus* ya descritos. Este tipo de pliegues podría ejercer cierta influencia durante la cópula dado que durante ésta, el pene sale del cuerpo del animal exponiendo toda su superficie interna (Borda obs. per.).

Siendo especies simpátricas y del mismo género, *M. l. leucostoma* y *M. florezi* presentan características poblacionales contrastantes. La primera particularidad es el tamaño poblacional, *M. l. leucostoma* presenta un tamaño poblacional superior en número con respecto a *M. florezi*, lo cual puede ser respuesta al grado de adaptabilidad que presenta *M. leucostoma*. Otra particularidad es que el patrón de pliegues internos del pene no resulta con la misma constancia en *M. florezi* con relación a *M. leucostoma*.

Los especímenes evaluados de *M. florezi* presentan un patrón en el que los pliegues se dividen al finalizar el tercio proximal del pene, pero la distribución de éstos es variable (Borda & Ramírez, 2013). Estas particularidades son una clara respuesta al origen independiente que presentan ambas especies, ya que corresponden a clados independientes, lo cual se infiere de la filogenia molecular de *Megalobulimus*.

### 6.3. Evolución de las poblaciones de los taxa en estudio

La diversidad genética es la base de la biología evolutiva y está relacionada con la complejidad del organismo (Lynch y Conery, 2003), el ambiente (Reusch *et al.*, 2005) y la habilidad de las especies de responder a los cambios del entorno (O'Brien, 1994). Para evaluar la salud genético-poblacional de los taxa en estudio dentro de un área considerada de alto endemismo (Swenson *et al.*, 2012), se consideraron dos marcadores mitocondriales, 16S rRNA y COI, que han sido ampliamente utilizados por el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la FCB-UNMSM para el estudio de moluscos.

De los datos obtenidos de los marcadores mitocondriales observamos la gran divergencia que existe entre los individuos de *M. l. leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 1 a partir de los datos de distancia genética (0,194 ( $\approx$ 19%) para 16S rRNA y 0,236 ( $\approx$ 23,6%) para COI. Hebert *et al.* (2003) establecieron un valor de 2% divergencia para la discriminación de especie mediante el marcador mitocondrial COI. Si se considera este valor, se descartaría cualquier relación cercana entre estos dos taxa. Ramirez *et al.* (2012) emplearon el marcador 16S rRNA, con los mismos fines que Hebert *et al.*, para la familia Strophocheilidae encontrando valores para divergencia interespecífica entre 9,49 – 23.36% excepto para *Megalobulimus popelairianus* y *M. thammianus* cuyo valor fue entre 1.85-4.10%. Para ambos marcadores, la divergencia genética encaja dentro de los valores que suponen la presencia de especies distintas. Esto mismo se puede concluir de la relación entre *M. l. leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 2, los cuales a pesar de tener similitudes en la forma de la concha y la superficie interna del pene,

presentan una divergencia genética mayor al 15% para los dos marcadores mitocondriales.

En el caso particular de *M. l. leucostoma*, las gráficas de saturación mutacional para ambos marcadores mostraron un comportamiento lineal de las transiciones sin alcanzar un grado de saturación, pero resulta particular el comportamiento de las transversiones, las cuales muestran una recta que se mantiene paralela al eje X, indicando mínima presencia de este tipo de mutaciones. Ello correspondería tal vez a una reciente diversificación en el grupo en estudio.

Las redes de haplotipos inferidas a partir de los marcadores 16S rRNA y COI para *M. l. leucostoma* muestran que no existe estructuración para todos los haplotipos excepto aquel que fue obtenido para la localidad de Huyro. Los individuos procedentes de esta localidad fueron colectados en una montaña lo que justifica el aislamiento evidenciado en las redes de haplotipos. Sin embargo, las otras localidades también cuentan con aislamiento geográfico entre sí dada la presencia de cuerpos de agua como quebradas y ríos, por ejemplo Sambaray y Pavayoc se encuentran separadas por el río Vilcanota, pero aun así comparten haplotipos para ambos marcadores. Asimismo, las localidades de Huayanay y Sambaray también comparten haplotipos para ambos marcadores. Esto sustentaría la idea de que la existencia de estos haplotipos es anterior a la aparición de los ríos, es decir un polimorfismo ancestral que por efecto de la deriva pudo fijarse (Brower, 1996).

Los patrones demográficos inferidos a través del marcador 16S rRNA y COI para las poblaciones de *M. l. leucostoma* nos dan muestra de la alta diversidad genética que poseen sus poblaciones, sobre todo respecto a su tamaño poblacional. Las gráficas de *mismatch distribution* nos presentan un panorama parecido al de las redes de haplotipo. Para el marcador mitocondrial 16S rRNA se obtuvo una red de haplotipos que responde al modelo en estrella o *star-like topology*, asimismo, la gráfica de *mismatch distribution* mostró una curva unimodal. Ambos resultados indican una reciente expansión poblacional en una población que atravesó un cuello de botella

genético. Por el contrario, el marcador COI presentó una red de haplotipos sin estructuración y una curva multimodal. Ambos resultados indican la ausencia de barreras al flujo génico dentro de las poblaciones ya que podemos observar un gran número de haplotipos diferentes. Esto se refleja también en los resultados de los test de neutralidad donde se indican expansión poblacional. Sin embargo, ¿por qué dos segmentos de un marcador molecular como es el genoma mitocondrial evidencian patrones tan diferentes?

Una observación importante dentro de este hecho es que el marcador COI presenta una mayor distancia genética en comparación con el marcador 16S rRNA entre los taxa en estudio. En el caso particular de *M. l. leucostoma*, el marcador COI muestra una mayor diversidad genética con respecto al marcador 16S rRNA. Un patrón similar se observa en *Megalobulimus* sp. 2, especie en la cual todos los individuos presentan el mismo haplotipo para el marcador 16S rRNA y dos haplotipos para COI. Mientras que *M. florezi* mostró un solo haplotipo para ambos marcadores. Congrains (2010) y Romero (2010) registraron un perfil distinto tanto para especies de la familia Strophocheilidae como Systrophiidae, respectivamente, en los cuales la mayor variabilidad se observaba en el gen 16S rRNA con respecto al COI. En general se considera que los genes de las subunidades de la citocromo oxidasa subunidad I están bajo presiones funcionales por lo que su tasa de divergencia es baja (Meiklejohn *et al.*, 2007). Más aún, siendo que el marcador 16S rRNA es una región no codificante, se esperaría que presente mayor variabilidad con respecto a un gen codificante como lo es el COI. Sin embargo, estos patrones ya han sido observados en otros moluscos terrestres de los géneros *Amplirhagada* (Köhler y Johnson, 2012) y *Rhagada* (Johnson *et al.*, 2012) en Australia. En el género *Amplirhagada* se observan distintos patrones de variación a nivel intraespecífico donde en algunos casos el COI puede tener mayor, igual o menor grado de variación que el marcador 16S rRNA, mientras que en el género *Rhagada* se observó que el COI presentó mayor variación intraespecífica con respecto al marcador 16S rRNA. Una explicación a este hecho es que posiblemente dentro de *M. leucostoma*, la región amplificada del 16S rRNA sea una región ligeramente más conservada que para otras especies, ya que los *primers* utilizados solo amplifican



hasta 400 pb del marcador cuyo tamaño es mayor a 700 pb. Esto explicaría por qué se encuentra menor variabilidad que en COI, dado que el grueso de la información disponible indica una mayor variabilidad para un marcador no codificante (16S rRNA) frente a uno codificante (COI).

Otro patrón importante es la variación a nivel intraespecífico. Chirinos (2012) encontró una gran diversidad haplotípica del marcador mitocondrial 16S rRNA en *M. huascari*, con 10 haplotipos encontrados en 29 individuos. Congrains (2010) reportó un solo haplotipo para distintas poblaciones de *M. capillaceus*, tal y como ocurrió con *M. florezi*, los cuales compartieron el mismo haplotipo para 16S rRNA. Ambos estudios emplearon los mismos *primers* empleados en el presente estudio. En conjunto, estos resultados son una prueba de la compleja evolución que ha seguido el genoma mitocondrial de especies del género *Megalobulimus*.

#### **6.4. Relaciones evolutivas dentro del género *Megalobulimus***

A partir de las filogenias obtenidas con el marcador mitocondrial 16S rRNA para las especies del género *Megalobulimus*, en donde se incluyeron las especies en estudio, es posible observar que *M. l. leucostoma*, *Megalobulimus* sp. 1 y *Megalobulimus* sp. 2 se posicionan en clados completamente diferentes, aunque los clados que los contienen tienen bajo soporte de *bootstrap* para el árbol de ML. Un bajo soporte de *bootstrap* es considerado menor a 75% (Hillis *et al.*, 1996) aunque Felsenstein (2004) considera que un nodo con buen soporte es aquel mayor a 95%. En el caso de IB, la probabilidad posterior es ligeramente más alta. Esta diferenciación molecular también es evidente a nivel morfológico, las características de la genitalia masculina presentan patrones completamente distintos. Por toda esta evidencia, es fuertemente soportado considerar a *Megalobulimus* sp. 1 como una especie independiente del complejo *leucostoma*.

Los patrones peneales y forma de la concha harían pensar que *Megalobulimus* sp. 2 podría tener cierto parentesco con *Megalobulimus leucostoma*. Por el contrario, el análisis filogenético con bases moleculares y las características de la genitalia femenina las posicionan en clados muy distintos, soportando la posición como especie independiente de *Megalobulimus* sp. 2.

El caso de *Megalobulimus florezi* y *M. capillaceus* resulta sorpresivo, ya que presentaron el mismo haplotipo para las secuencias de 16S rRNA, aunque presentan diferencias a nivel de concha y genitalia (Borda y Ramírez, 2013). Ello podría deberse a que los caracteres como la concha y la genitalia tendrían una mayor presión del ambiente, por lo que serían los primeros caracteres en diferenciarse (Goodfriend, 1986; Seeley, 1986; Tan, 1999; Koene y Schulenburg, 2005). Sin embargo, el tiempo transcurrido no habría sido el suficiente como para acumular mutaciones diferenciales en dicho marcador para cada una de las dos especies.

Un caso similar se ha observado en *M. oblongus* de Colombia (Jaramillo *et al.*, 2014). Los autores reportaron un único haplotipo para los marcadores mitocondriales 16S rRNA y COI presente en seis localidades sugiriendo que esta especie se encuentra en peligro. Este mismo patrón fue observado para *M. capillaceus* de San Martín (Congrains, 2010) para los mismos marcadores mitocondriales. Estos resultados sumados a la abundancia de individuos que presentan las poblaciones de estas especies indicarían que estas especies tienen estrategias reproductivas eficientes para adaptarse al medio en aparente ausencia de diversidad genética en los marcadores mitocondriales analizados. Existe evidencia de autofecundación en moluscos terrestres con abundantes poblaciones y que presentan escasa diversidad genética (Selander y Kaufman, 1973). La capacidad de la autofecundación sería una de las causantes de esta posible ausencia de diversidad genética para estos marcadores.

La observación de clados cuyos integrantes divergen en características de la concha aporta en la “declaración” de que este carácter no serviría para formar grupos

monofiléticos (Sherley, 1996). Estos caracteres pueden servir para diagnosis, pero no han sido útiles para evidenciar relaciones evolutivas, ya que especies con proporciones y características diferentes en la concha no necesariamente forman grupos monofiléticos (Breure y Romero, 2012). De manera global las filogenias moleculares del género *Megalobulimus* nos dejan claro la presencia de dos clados diferenciados por la presencia del peristoma rojo. El clado B, caracterizados por la presencia del peristoma blanco (Figura 37 y 38), excepto en *M. separabilis*, presenta una tendencia en la cual los clados más derivados habitan en regiones más al norte en los Andes. Dicho patrón ha sido observado en otras especies (Emshwiller, 2002; Doan, 2003; Picard *et al.*, 2007) y estaría relacionado con la elevación de los Andes y dispersión y diversificación de las especies en relación a este proceso geológico. Para tener certeza de esta tendencia es necesario incluir otras especies de *Megalobulimus* o utilizar un nuevo marcador molecular debido al bajo soporte de *bootstrap* y probabilidad posterior que mostraron algunos grupos dentro del clado B.

## 6.5. Estatus taxonómico

La presente investigación evaluó dos problemáticas, a nivel intraespecífico e interespecífico, mediante la caracterización morfológica y uso de herramientas moleculares en cuatro taxa de *Megalobulimus* de la vertiente suroriental de los Andes peruanos. La evaluación a nivel intraespecífico para *M. leucostoma* es la que nos ha permitido reconsiderar su estatus taxonómico.

La evidencia basada en el análisis morfométrico de las tres subespecies de *M. leucostoma* ha permitido identificar que *M. l. weyrauchi* sería una variante simpátrica de *M. l. leucostoma*. Al estar en simpatría con *M. l. leucostoma*, *M. l. weyrauchi* perdería su estatus de subespecie. Al disponer únicamente de la concha para poder realizar una caracterización completa de *M. l. weyrauchi*, ya que la descripción fue realizada únicamente sobre los caracteres de ésta, es que no existe un sustento adecuado para su posición como subespecie.

El caso de *M. l. lacunosus* resulta menos complicado dadas las diferencias entre los ejemplares tipo y las conchas de *M. l. leucostoma* evidenciadas en el análisis de morfometría clásica y geométrica, esto indicaría que podrían ser entidades independientes; se requeriría de topotipos para una correcta discriminación entre estas subespecies. En el caso de *Megalobulimus* sp. 1, éstos se diferencian de las subespecies de *M. leucostoma* a nivel de la concha. El análisis de la anatomía interna, la distancia genética y la filogenia molecular otorgan un fuerte soporte a la discriminación de individuos procedentes de Puno como una especie nueva.

Por todo esto, *M. leucostoma* sensu stricto tendría una condición endémica restringida al norte de Cusco, incluyendo a *M. l. weyrauchi* como una sinonimia para dicha especie. El hecho de que *Megalobulimus leucostoma* presente una extensa sinonimia (Bequaert, 1948) es solo el ejemplo de la confusión que generaban los caracteres conquiológicos en la identificación de una especie, especialmente en una especie con una amplia variabilidad en formas y tamaños de la concha como lo es *M. leucostoma*.

El objetivo de esta tesis fue identificar los patrones de polimorfismos molecular y morfológico en las especies de moluscos terrestres del género *Megalobulimus* presentes en el sur de los Andes del Perú. Los resultados obtenidos demuestran que los patrones a nivel anatómico y molecular en los cuatro taxa de estudio (*M. leucostoma*, *Megalobulimus* sp. 1, *Megalobulimus* sp. 2 y *M. florezi*) no siguen una misma tendencia sino un complejo conjunto de respuestas buscando adaptarse a su entorno. Finalmente, todo esto es un reflejo de los complicados caminos que ha seguido la evolución de las especies en los Andes.

## 7. CONCLUSIONES:

- En base a la revisión de ejemplares tipo y análisis morfométrico, la subespecie *Megalobulimus leucostoma lacunosus* se diferencia del típico *leucostoma* por las proporciones de la concha, principalmente por el tamaño de la espira, por lo que se debe considerar como una especie independiente.
- Las características de la concha observadas en la revisión de ejemplares tipo y análisis morfométrico demuestra que *Megalobulimus leucostoma weyrauchi* no presentan caracteres que sustenten su estatus de subespecie sino que es parte de la variabilidad de la concha de *M. l. leucostoma*.
- El análisis morfológico demuestra que las características externas de la genitalia pueden ser muy variables (forma y proporciones del pene, epífalo, vagina, oviducto libre), sin embargo, las características internas de estos órganos pueda presentar patrones constantes como en *M. leucostoma* y *Megalobulimus* sp. 2.
- La presencia de un mismo haplotipo para el marcador mitocondrial 16S rRNA en *Megalobulimus florezi* Borda y Ramirez, 2013 y *Megalobulimus capillaceus* (Pfeiffer, 1855), morfológicamente diferenciables, podría indicar una divergencia reciente por lo cual aún no se han podido acumular cambios a nivel de dicho marcador mitocondrial.
- Las poblaciones de *M. leucostoma* muestran una alta diversidad genética y haplotipos compartidos para los marcadores mitocondriales 16S rRNA y COI en diferentes localidades que se encuentran separadas entre ríos, lo cual indicaría que el tamaño efectivo poblacional alto de esta especie ayudaría a mantener la presencia de haplotipos ancestrales.
- Los caracteres de la concha han sido útiles para la diagnosis de especies de *Megalobulimus* pero no son útiles para la formación de grupos monofiléticos.
- En base a los análisis morfológicos y moleculares, queda sustentada la independencia de *Megalobulimus* sp. 1 (Características de la superficie interna de genitalia masculina y distancia genética) y *Megalobulimus* sp. 2 (Características de la concha, superficie interna de la genitalia femenina y distancia genética), frente a las especies de *Megalobulimus* previamente descritas, por lo que constituyen especies nuevas para la ciencia

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, H. y A. Adams. 1855. The genera of recent Mollusca, arranged according to their organisation. 661 pp.

Albers, J. C. 1850. Die Heliceen, nach natürlicher Verwandtschaft systematisch geordnet. W. Engelmann. 262 pp.

Baker, H. B. 1926. The Mollusca collected by the University of Michigan - Williamson Expedition in Venezuela Part IV. Occasional Papers of the Museum of Zoology University of Michigan 167:1-49.

Bandelt, H.-J.; P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48.

Beamont, A. y P. Cassier. 1970. Travaux pratiques de Biologie animale. DUNOD. 480 pp.

Beck, H. H. 1837. Index molluscorum praesentis aevi musei principis augustissimi Christiani Frederici. Hafniae. 124 pp.

Beese, K.; K. Beier y B. Baur. 2006. Coevolution of male and female reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. *Journal of evolutionary biology* 19:410-418.

Benson, D. A.; M. Cavanaugh; K. Clark; I. Karsch-Mizrachi; D. J. Lipman; J. Ostell y E. W. Sayers. 2013. GenBank. *Nucleic acids research* 41:D36-D42.

Bequaert, J. C. 1948. Monograph of the Strophocheilidae, a Neotropical family of terrestrial mollusks. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 100:1-210.

Bequaert, J. C. 1949. Three new south american land snails (*Strophocheilus*, *Thaumastus*, *Drymaeus*). *The Nautilus* 62:113 - 115.

Blume, W. 1920. Vier neue Landschnecken. *Archiv für Molluskenkunde* 52:127-130.

Borda, V.; R. Ramírez y P. Romero. 2010. Glándula pediosa de moluscos terrestres y sus implicancias evolutivas, con énfasis en *Megalobulimus*. Revista Peruana de Biología 17:43-52.

Borda, V. y R. Ramírez. 2013. Re-characterization of the Red-lip *Megalobulimus* (Gastropoda: Strophocheilidae) from Peru with description of a new species. Zoologia (Curitiba) 30:675-691.

Bouchet, P. y J.-P. Rocroi. 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. Malacologia 47:397pp.

Breure. 1979. Systematics, phylogeny and zoogeography of Bulimulinae (Mollusca). NCB Naturalis. 200 pp.

Breure, A. S. y P. E. Romero. 2012. Support and surprises: molecular phylogeny of the land snail superfamily Orthalicoidea using a three-locus gene analysis with a divergence time analysis and ancestral area reconstruction (Gastropoda: Stylommatophora). Archiv für Molluskenkunde: International Journal of Malacology 141:1-20.

Brower, A. V. 1996. Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: a phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. Evolution 195-221.

Brumfield, R. T. y S. V. Edwards. 2007. Evolution into and out of the Andes: A bayesian analysis of historical diversification in *Thamnophilus* antshrikes. Evolution 61:346-367.

Burch, J. 1962. How to know the Eastern land snails. WM. C. Brown Company Publishers. 214.

Cadena, C. D. 2007. Testing the role of interspecific competition in the evolutionary origin of elevational zonation: An example with *Buarremon* brush-finches (Aves, Emberizidae) in the neotropical mountains. Evolution 61:1120-1136.

Campoverde, L. 1992. Posibilidad de manejo del caracol terrestre *Megalobulimus maximus* como recurso proteínico en San Martín. Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional Agraria La Molina.

Carvajal-Rodríguez, A.; P. Conde-Padín y E. Rolán-Alvarez. 2005. Decomposing shell form into size and shape by geometric morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis*. *Journal of Molluscan Studies* 71:313-318.

Catlow, A. y L. Reeve. 1845. *The Conchologist's Nomenclator: A Catalogue of All the Recent Species of Shells*. Reeve Brothers. 326.

Clench, W. y R. Turner. 1962. *New Names Introduced by H. A. Pilsbry in the Mollusca and Crustacea*. Special Pub. 4 of the academy of Natural Sciences of Philadelphia. 218 pp.

Congrains, C. 2010. Ayudando a descifrar el enigma taxonómico, el código de barras de ADN de *Megalobulimus* spp.(Mollusca, Gastropoda) del departamento de San Martín–Perú. Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Chaves, J. A. y T. B. Smith. 2011. Evolutionary patterns of diversification in the Andean hummingbird genus *Adelomyia*. *Molecular phylogenetics and evolution* 60:207-218.

Chirinos, J. 2012. Diversidad genética y estructura poblacional de *Megalobulimus huascari* (Gastropoda, Megalobulimidae), especie promisorio del biocomercio nacional. Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Chumbe, A. 2009. Evolución del complejo de especies *Bostryx modestus* basado en el gen de la citocromo C Oxidasa subunidad I del genoma mitocondrial. Bachiller en Genética y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

d'Orbigny, A. 1835. *Voyage dans l'Amérique Méridionale*. Vol. 5. Part 3. Mollusques. P. Bertrand, Paris, xliii. 758 pp.

d'Orbigny, A. 1837. *Voyage dans l'Amérique Méridionale*. 758 pp.

Dall, W. H. 1912. Report on landshells collected in Peru in 1911 by the Yale Expedition under Professor Hiram Bingham: with descriptions of a new subgenus, a new species, and new varieties. *Smithsonian Institution Miscellaneous Collection* 59:1-12.



Darriba, D.; G. L. Taboada; R. Doallo y D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772-772.

Davison, A. 2002. Land snails as a model to understand the role of history and selection in the origins of biodiversity. *Population Ecology* 44:0129-0136.

de Thoisy, B.; A. da Silva; M. Ruiz-García; A. Tapia; O. Ramirez; M. Arana; V. Quse; C. Paz-y-Miño; M. Tobler; C. Pedraza y A. Lavergne. 2010. Population history, phylogeography, and conservation genetics of the last Neotropical mega-herbivore, the lowland tapir (*Tapirus terrestris*). *BMC evolutionary biology* 10:278.

Doan, T. M. 2003. A south-to-north biogeographic hypothesis for Andean speciation: evidence from the lizard genus *Protoporus* (Reptilia, Gymnophthalmidae). *Journal of Biogeography* 30:361-374.

Dohrn, H. 1863. Beschreibung neuer peruanischer Landschnecken. *Malakozoologische Blätter* 10:152-156.

Dourojeanni, M. J. 1965. Denominaciones vernaculares de insectos y algunos otros invertebrados en la Selva del Perú. *Revista Peruana de Entomología* 8:131-137.

Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

Duellman, W. E. 1999. Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. JHU Press. 648 pp.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32:1792-1797.

Emshwiller, E. 2002. Biogeography of the *Oxalis tuberosa* alliance. *The Botanical Review* 68:128-152.

Felsenstein, J. 2004. Inferring phylogenies. Sinauer Associates Sunderland. 645pp.

Flórez, A. 1970. Moluscos de interés económico del Oriente Cusqueño (Familia Acauidae). Publicaciones del Departamento Académico de Zoología y Entomología - Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco 1:27-31.

Folmer, O.; M. Black; W. Hoeh; R. Lutz y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.

Fu, Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.

García-Moreno, J. y J. Fjeldså. 2000. Chronology and mode of speciation in the Andean avifauna. *Bonner zoologische Monographien* 46:25-46.

García-París, M.; M. Alcobendas; D. Buckley y D. B. Wake. 2003. Dispersal of viviparity accross contact zones in iberian populations of fire salamanders (*Salamandra*) inferred from discordance of genetic and morphological traits. *Evolution* 57:129-143.

Gómez, B. J. 2001. Structure and Functioning of the Reproductive System. 307-330. *In: G. M. Barker (Eds) The biology of terrestrial mollusks*. CABI Publishing, 558p.

Goodfriend, G. A. 1986. Variation in Land-snail Shell form and Size and its Causes: a Review. *Systematic Biology* 35:204-223.

Graves, G. R. 1988. Linearity of geographic range and its possible effect on the population structure of Andean birds. *The Auk* 105:47-52.

Hammer, Ø.; D. Harper y P. Ryan. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. . *Paleontología Electrónica* 4:1-9.

Haszprunar, G. y G. Huber. 1990. On the central nervous system of Smeagolidae and Rhodopidae, two families questionably allied with the Gymnomorpha (Gastropoda: Euthyneura). *Journal of Zoology* 220:185-199.

Hebert, P. D. N.; A. Cywinska; S. L. Ball y J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270:313-321.

Hillis, D. M.; B. K. Mable y C. Moritz. 1996. Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. 515-543. *In: D. M. Hillis, B. K. Mable and C. Moritz (Eds) Molecular systematics*. Sinauer Associates Sunderland, MA.

Holdridge, L. R. 1947. Determination of World Plant Formations from Simple Climatic Data. *Science* 105:367-368.

Hollander, J.; C. M. Smadja; R. K. Butlin y D. G. Reid. 2013. Genital divergence in sympatric sister snails. *Journal of Evolutionary Biology* 26:210-215.

Huang, X. y A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9:868-877.

Hugall, A.; C. Moritz; A. Moussalli y J. Stanisic. 2002. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:6112-6117.

Hupé, H. 1857. Mollusques. 1-96. *In*: F. Castelnau (Eds) Animaux nouveaux ou rares recueillis pendant l'expédition dans les parties centrales de l'Amérique du Sud, de Rio de Janeiro à Lima au Peru. Chez P. Bertrand.

Hylton-Scott, M. L. 1939. Estudio anatómico de Borus "Strophocheilus lorentzianus" (Doer). *Revista del Museo de la Plata* 7:217-278.

Jaramillo, E.; J. López Martínez; R. Ramírez y L. E. Velásquez Trujillo. 2014. Análisis morfológico del sistema reproductor e identificación molecular a través de los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA de *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Strophocheilidae) de Colombia. *Revista Peruana de Biología* 21:079-088.

Johnson, M. S.; Z. R. Hamilton; R. O. Y. Teale y P. G. Kendrick. 2012. Endemic evolutionary radiation of Rhagada land snails (Pulmonata: Camaenidae) in a continental archipelago in northern Western Australia. *Biological Journal of the Linnean Society* 106:316-327.

Killeen, T. J.; M. Douglas; T. Consiglio; P. M. Jørgensen y J. Mejia. 2007. Dry spots and wet spots in the Andean hotspot. *Journal of Biogeography* 34:1357-1373.

Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11:353-357.

Koene, J. M. y H. Schulenburg. 2005. Shooting darts: co-evolution and counter-adaptation in hermaphroditic snails. *BMC Evolutionary Biology* 5:25.

Köhler, F. y M. S. Johnson. 2012. Species limits in molecular phylogenies: a cautionary tale from Australian land snails (Camaenidae: Amplirhagada Iredale, 1933). *Zoological Journal of the Linnean Society* 165:337-362.

Lamas, G. 1982. A preliminary zoogeographical division of Peru, based on butterfly distributions (Lepidoptera, Papilionoidea). 336 - 357. *In*: G. T. Prance (Eds) *The biological model for diversification in the tropics*. Columbia University Press.

Leme, J. L. M. 1973. Anatomy and systematics of the Neotropical Strophocheiloidea (Gastropoda, Pulmonata) with the description of a new family. *Arquivos de Zoologia* 23:295-337.

Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.

Lydeard, C.; R. H. Cowie; W. F. Ponder; A. E. Bogan; P. Bouchet; S. A. Clark; K. S. Cummings; T. J. Frest; O. Gargominy y D. G. Herbert. 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience* 54:321-330.

Lynch, M. y J. S. Conery. 2003. The origins of genome complexity. *Science* 302:1401-1404.

Martens, E. 1876. Die Bulimus-Arten aus der Gruppe Borus. *In*: Pfeiffer, K. (Ed), *Novitates Conchologicae. Series Prima. Mollusca extramarina. Beschreibung und Abbildung neuer oder kritischer Land- und Süßwassermollusken* 5:1-26.

Martins, A. d. F. 1991. Comparative anatomy of populations of *Oxychulus* (*Drouetia*) *atlanticus* (Morelet et Drout, 1857) (Pulmonata, Zonitidae) from Sao Miguel Island, Azores. *Proceedings of Tenth International Malacological Congress (Tubingen 1989)* 571 - 575.

Masta, S. E. y W. P. Maddison. 2002. Sexual selection driving diversification in jumping spiders. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:4442-4447.

Mayr, E. 1982. Of what use are subspecies? *The Auk* 99:593-595.

McCarthy, C. 1996. Chromas: version 1.3. Griffith University. .

Meiklejohn, C. D.; K. L. Montooth y D. M. Rand. 2007. Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends in Genetics* 23:259-263.

Miller, K. 1878. Die Binnenmollusken von Ecuador. *Malakozoologische Blätter* 25:153-199.

Miller, M. J.; E. Bermingham; J. Klicka; P. Escalante; F. S. R. do Amaral; J. T. Weir y K. Winker. 2008. Out of Amazonia again and again: episodic crossing of the Andes promotes diversification in a lowland forest flycatcher. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275:1133-1142.

Morelet, A. 1863. Séries conchyliologiques comprenant l'énumération de Mollusques terrestres et fluviátiles. III PEROU. 221 pp.

Moritz, C.; J. L. Patton; C. J. Schneider y T. B. Smith. 2000. Diversification o rainforest faunas: An Integrated Molecular Approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:533-563.

Moussalli, A.; D. G. Herbert y D. Stuart-Fox. 2009. A phylogeny of the cannibal snails of southern Africa, genus *Natalina* sensu lato (Pulmonata: Rhytididae): Assessing concordance between morphology and molecular data. *Molecular phylogenetics and evolution* 52:167-182.

Müller, O. 1774. *Vermium terrestrium et fluviatilium*. I:1-214.

Myers, N.; R. A. Mittermeier; C. G. Mittermeier; G. A. Da Fonseca y J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press. 512 pp.

Nordsieck, H. 1985. The system of the Stylommatophora (Gastropoda), with special regard to the systematic position of the Clausiliidae. I: Importance of the excretory and genital systems. *Archiv für Molluskenkunde der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 116:1-24.

Nordsieck, H. 1990. Phylogeny and system of the Pulmonata (Gastropoda). *Archiv für Molluskenkunde der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 121:31-52.

O'Brien, S. J. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:5748-5755.

Pacheco, V.; R. Cadenillas; E. Salas; C. Tello y H. Zeballos. 2011. Diversidad y endemismo de los mamíferos del Perú. *Revista Peruana de Biología* 16:005-032.

Parra, J. L.; J. V. Remsen Jr; M. Alvarez-Rebolledo y J. A. McGuire. 2009. Molecular phylogenetics of the hummingbird genus *Coeligena*. *Molecular phylogenetics and evolution* 53:425-434.

Pfeiffer, L. 1848. *Monographia heliceorum viventium*. Brockhaus. 594 pp.

Pfeiffer, L. 1855. Descriptions of Forty - seven - new species of Helicea, from collections of H. Cumings. *Proceedings of Zoological Society of London* 91-101.

Pfeiffer, L. 1879. *Nomenclator heliceorum viventium quo continentur nomina omnium hujus familiae generum et specierum hodie cognitarum disposita ex affinitate naturali* 618 pp.

Pfenninger, M.; M. Cordellier y B. Streit. 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). *BMC evolutionary biology* 6:100.

Picard, D.; T. Sempere y O. Plantard. 2007. A northward colonisation of the Andes by the potato cyst nematode during geological times suggests multiple host-shifts from wild to cultivated potatoes. *Molecular phylogenetics and evolution* 42:308-316.

Pilsbry, H. 1895. American bulimi and bulimuli. *Strophocheilus, Plekocheilus, Auris, Bulimulus*. *Manual of Conchology* 2:1-213.

Pilsbry, H. 1940. Land Shell from Huánuco, Peru. *Notulae Naturae (Ac. Nat. Sci. Phila.)* 56:1-5.

Pilsbry, H. A. 1902. Classification of Bulimulidae and index to volumes X, XI, XII, XIII and XIV. *Acad. of Natural Sciences, Conchological Sect.* i-xcic.

Quiñonez Zumaeta, A. 2010. Filogeografía de los picaflores incas *Coeligena coeligena* y *Coeligena torquata* en los Andes tropicales. TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA. Unidad de Biología Integrativa, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Ramírez, J. 2009. Genómica evolutiva de *Bostryx aguilari* (Gastropoda: Orthalicidae), relaciones filogenéticas con otros Orthalicidos del Perú. Título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Ramírez, R. y S. Cáceres. 1991. Caracoles terrestres (Mollusca, Gastropoda) comestibles en el Perú. Boletín de Lima (Peru). (Set 1991) 67–74.

Ramírez, R.; C. Paredes y J. Arenas. 2003. Moluscos del Perú. Revista de Biología Tropical 51:225-284.

Ramírez, R. 2004. Sistemática e Filogeografia dos Moluscos do Ecosistema de “Lomas” do Deserto da Costa Central do Peru. Doutorado em Zoologia. Faculdade de Biociências, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Ramírez, R.; J. Ramirez y P. Ramirez. 2011. The enigmatic phylogenetic position os Scolodontidae: a thrid stylommatophoran clade. 118-126. *In*: M. A. Fernandez, S. B. d. Santos, A. D. Pimenta and S. C. Thiengo (Eds) Tópicos em Malacologia - Ecos do XIX Encontro Brasileiro de Malacologia. 1ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacología, 2011.

Ramírez, R.; V. Borda; P. Romero; J. Ramirez; C. Congrains; J. Chirinos; P. Ramírez; L. E. Velásquez y K. Mejía. 2012. Biodiversidad y endemismo de los caracoles terrestres *Megalobulimus* y *Systrophia* en la Amazonia occidental. Revista Peruana de Biología 19:059-074.

Rengifo, A. d. P.; P. Padilla y L. Mori. 2003. Caracterización Morfológica del “Congompe” *Megalobulimus maximus* (Sowerby, 1825) y posibilidades de su cultivo, Iquitos-Perú. Memorias: Manejo de Fauna Silvestre en Amazonia y Latinoamérica 269 -275.

Reusch, T. B.; A. Ehlers; A. Hämmerli y B. Worm. 2005. Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:2826-2831.

Rogers, A. R. y H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution 9:552-569.

Rohlf, F. J. y D. Slice. 1990. Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Systematic Zoology* 39:40-59

Rohlf, F. J. 2010. TpsDig version 2.16. Stony Brook University.

Rohlf, J. y L. F. Marcus. 1993. A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution* 8:129-132.

Romero, P. 2008. Diversidad y estructura genética de *Bostryx scalariformis* (Mollusca, Gastropoda) en base a polimorfismos del gen mitocondrial 16S rRNA. Título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Romero, P. 2010. Filogeografía de *Systrophia helycicloides*: El reflejo de la dinámica del bosque lluvioso tropical en los genes 16S rRNA y COI de moluscos terrestres. Grado de Magister. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.

Rowson, B.; P. Tattersfield y W. O. C. Symondson. 2011. Phylogeny and biogeography of tropical carnivorous land-snails (Pulmonata: Streptaxoidea) with particular reference to East Africa and the Indian Ocean. *Zoologica Scripta* 40:85-98.

Rull, V. 2007. On the origin of present Neotropical biodiversity: a preliminary meta-analysis about speciation timing using molecular phylogenies. *Orsis* 22:105–119.

Saiki, R. D.; S. Gelfand; S. Stoffel; R. Scharf; G. Higuchi; K. Horn; K. Mullis y H. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487 - 491.

Salvini-Plawén, L. y G. Steiner. 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. 29-51. *In*: J. Taylor (Eds) *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Oxford University Press.

Särkinen, T.; R. T. Pennington; M. Lavin; M. F. Simon y C. E. Hughes. 2012. Evolutionary islands in the Andes: persistence and isolation explain high endemism in Andean dry tropical forests. *Journal of Biogeography* 39:884-900.



Schilthuizen, M. y M. Haase. 2010. Disentangling true shape differences and experimenter bias: are dextral and sinistral snail shells exact mirror images? *Journal of Zoology* 282:191-200.

Seeley, R. H. 1986. Intense natural selection caused a rapid morphological transition in a living marine snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:6897-6901.

Selander, R. K. y D. W. Kaufman. 1973. Self-fertilization and genetic population structure in a colonizing land snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:1186-1190.

Semper, C. y H. Simroth. 1894. *Reisen in Archipel der Philippinen*. 594 pp.

Sherley, G. 1996. Morphological variation in the shells of *Placostylus* species (Gastropoda: Bulimulidae) in New Zealand and implications for their conservation. *New Zealand Journal of Zoology* 23:73-82.

Slatkin, M. y R. R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129:555-62.

Solem, A. 1984. A world model of land snail diversity and abundance. 6-22. *In*: A. a. A. v. B. Solem (Eds) *World-wide Snails, Biogeographical studies on non-marine mollusca*. E. Brill / W. Backhyus.

Solomon, S. E.; M. Bacci, Jr.; J. Martins, Jr.; G. G. Vinha y U. G. Mueller. 2008. Paleodistributions and Comparative Molecular Phylogeography of Leafcutter Ants (*Atta* spp.) Provide New Insight into the Origins of Amazonian Diversity. *PloS one* 3:e2738.

Sowerby, G. 1835. Shells collected by Mr. Cuming on the western coast of South America, and among the islands of the South Pacific Ocean. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1834:123-128.

Sowerby, G. 1838. *The Conchological Illustrations*, 149th-150th Parts. London. 8 pp.

Stamatakis, A.; P. Hoover y J. Rougemont. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology* 57:758-771.

Steppan, S. J.; C. Zawadzki y L. R. Heaney. 2003. Molecular phylogeny of the endemic Philippine rodent *Apomys* (Muridae) and the dynamics of diversification in an oceanic archipelago. *Biological Journal of the Linnean Society* 80:699-715.

Swenson, J. J.; B. E. Young; S. Beck; P. Comer; J. H. Córdova; J. Dyson; D. Embert; F. Encarnación; W. Ferreira; I. Franke; D. Grossman; P. Hernandez; S. K. Herzog; C. Josse; G. Navarro; V. Pacheco; B. A. Stein; M. Timaná; A. Tovar; C. Tovar; J. Vargas y C. M. Zambrana-Torrel. 2012. Plant and animal endemism in the eastern Andean slope: challenges to conservation. *BMC Ecology* 12:1.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism *Genetics* 123:585-595.

Tamura, K.; D. Peterson; N. Peterson; G. Stecher; M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.

Tan, K. 1999. Imposex in *Thais gradata* and *Chicoreus capucinus* (Mollusca, Neogastropoda, Muricidae) from the Straits of Johor: A Case Study using Penis Length, Area and Weight as Measures of Imposex Severity. *Marine Pollution Bulletin* 39:295-303.

Wade, C. M.; P. B. Mordan y B. Clarke. 2001. A phylogeny of land snails (Gastropoda: Pulmonata). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268:413-422.

Wade, C. M.; P. B. Mordan y F. Naggs. 2006. Evolutionary relationships among the Pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society* 87:593-610.

Watterson, G. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical population biology* 7:256-276.

Wilson, E. O. y W. Brown. 1953. The subspecies concept and its taxonomic application. *Systematic Zoology* 2:97-111.

Xia, X. 2013. DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30:1720-1728.

## **9. ANEXO**

TRABAJOS ORIGINALES

## Análisis morfométrico para la discriminación de especies: el caso del complejo *Megalobulimus leucostoma*

### Morphometric analysis to discriminate between species: The case of the *Megalobulimus leucostoma* complex

Victor Borda <sup>1,2</sup> y Rina Ramirez <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Malacología y Carcinología - Museo de Historia Natural – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.

Corresponding author: Victor Borda

Email Victor Borda: vicbp1@gmail.com

Email Rina Ramirez: rina\_rm@yahoo.com

#### Citación:

Borda V. & R. Ramirez. 2014. Análisis morfométrico para la discriminación de especies: el caso del complejo *Megalobulimus leucostoma*. Revista peruana de biología 21(2): 117 - 124 (Octubre 2014). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v21i2.9814>

#### Fuentes de financiamiento:

El presente trabajo fue financiado por:

Beca Rufford Small Grants Foundation otorgada a Victor Borda.

Proyecto VRI–CSI101001091 de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos otorgado a Rina Ramirez.

#### Resumen

La plasticidad de los caracteres conchiliológicos ha conllevado a diversas descripciones erróneas y a la acumulación de sinonimias lo cual ha dificultado la discriminación entre especies. El género de moluscos terrestres *Megalobulimus* es un ejemplo de esta problemática. Dentro de éste se encuentra *Megalobulimus leucostoma* (Sowerby, 1835), que presenta tres subespecies las cuales no se logran diferenciar correctamente a partir de sus descripciones originales. El presente estudio busca discriminar a las subespecies de *Megalobulimus leucostoma* a partir del análisis morfométrico y de distribución. Ambos análisis establecen diferencias sustanciales entre *M. l. leucostoma* y *M. l. lacunosus* que no soportarían el estatus de subespecie de esta última. *Megalobulimus leucostoma weyrauchi* se ubica dentro de la gran gama de variabilidad conchiliológica de *M. l. leucostoma* y sus datos de distribución lo ubican en simpatria con la misma por lo cual su estatus como subespecie no estaría soportado, y podría considerarse como parte de *M. l. leucostoma*.

**Palabras clave:** Morfometría; Megalobuliminae; conchilla; moluscos terrestres.

#### Abstract

Plasticity of conchological characters had led to erroneous descriptions and the accumulation of synonyms making difficult the discrimination among species. The land snail genus *Megalobulimus* is an example of this problem. *Megalobulimus leucostoma* (Sowerby, 1835) has three subspecies which are difficult to differentiate by using the original descriptions. The aim of this paper is to discriminate among the subspecies of *M. leucostoma* by using morphometric and distribution analyses. Both provide substantial differences between *M. l. leucostoma* and *M. l. lacunosus* that would not support the subspecies status of the former. *Megalobulimus leucostoma weyrauchi* fits into the great conchological variability of *M. l. leucostoma*; also the sympatric status between these two subspecies would not support the subspecies status of the former, and *M. l. weyrauchi* should be considered as part of *M. l. leucostoma*.

**Keywords:** morphometry; Megalobuliminae; shell; land mollusks.

#### Introducción

Uno de los problemas recurrentes en la discriminación de especies de moluscos es que la mayoría de sus descripciones están basadas en las características de las conchillas. Si bien existen casos en los que la diferenciación por caracteres conchiliológicos es eficiente, se considera que estos caracteres son afectados por evolución paralela o convergente en diferentes taxa (Suvorov 2002). La Subfamilia Megalobuliminae (Leme) (Familia Strophocheilidae) encaja dentro de esta problemática. Es una subfamilia de un único género, con cerca de 50 especies nominales y donde se encuentran los gasterópodos terrestres de mayor tamaño en la región neotropical (Bequaert 1948, Ramírez et al. 2003, Simone 2006), algunos de los cuales poseen gran relevancia ecológica y económica (Ramírez & Cáceres 1991). Esta subfamilia ha tenido posición controversial, desde ser considerada un subgénero (Bequaert 1948), tomar la posición de familia (Leme 1973), hasta actualmente ser considerada una subfamilia (Bouchet & Rocroi 2005). La mayoría de estas especies se encuentran descritas a partir de su concha. Esto ha generado numerosas controversias sobre la determinación correcta de algunas especies ya que los caracteres conchiliológicos resultan ser muy plásticos (Borda & Ramírez 2013).

Presentado: 21/10/2013  
Aceptado: 15/01/2014  
Publicado online: 07/10/2014

**Journal home page:** <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citadas. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con [editor.revperubiol@gmail.com](mailto:editor.revperubiol@gmail.com).

Para la vertiente oriental del sur de los Andes peruanos se han reportado cuatro especies de *Megalobulimus* (Miller): *M. popelairianus* (Nyst, 1845), *M. maximus* (Sowerby, 1825), *M. leucostoma* (Sowerby, 1835) y *M. florezi* Borda & Ramírez, 2013. *Megalobulimus leucostoma* presenta la particularidad de tener tres subespecies descritas, dos de las cuales han sido reportadas para el departamento del Cusco, *M. leucostoma leucostoma* (Sowerby, 1835) y *M. leucostoma weyrauchi* (Bequaert, 1949). La tercera subespecie, *M. leucostoma lacunosus* (d'Orbigny, 1835), ha sido descrita para el departamento de Puno y en Bolivia. En las descripciones originales de estas subespecies la localidad tipo de *M. l. weyrauchi* no es totalmente clara, además no aclaran las diferencias entre las subespecies *M. l. leucostoma* y *M. l. lacunosus*. La imprecisión de las descripciones originales lleva a considerar incierto el estatus taxonómico de *M. leucostoma*, pues existen características conchiliológicas entre las tres subespecies que ponen en duda su unidad como especie. El objetivo del presente trabajo es evaluar, a nivel morfométrico, similitudes y diferencias de las conchas entre las tres subespecies contrastadas con sus distribuciones geográficas las cuales podrían ayudar a una mejor caracterización y definición del estatus taxonómico de estos taxa.

### Material y métodos

Las colectas se llevaron a cabo durante febrero, marzo y junio del 2012 en las provincias de La Convención, Urubamba y Calca, pertenecientes al departamento de Cusco, y la provincia de Carabaya en el departamento de Puno. El método de colecta fue búsqueda directa. Los especímenes colectados fueron depositados en la colección malacológica del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (MUSM). Asimismo, se consideraron ejemplares tipo custodiados en el Natural History Museum of the United Kingdom (NHM-UK), correspondientes a *Helix mathiusii* (d'Orbigny, 1835), dos de *Helix lacunosus* (d'Orbigny, 1835); el primero es considerado sinónimo de *M. l. leucostoma*. Además, se consideró material tipo de *M. leucostoma weyrauchi*

custodiado en el Museum of Comparative Zoology of Harvard University (MCZ) y Academy of Natural Sciences of Drexel University (ANSP) (Tabla 1 y Fig. 1).

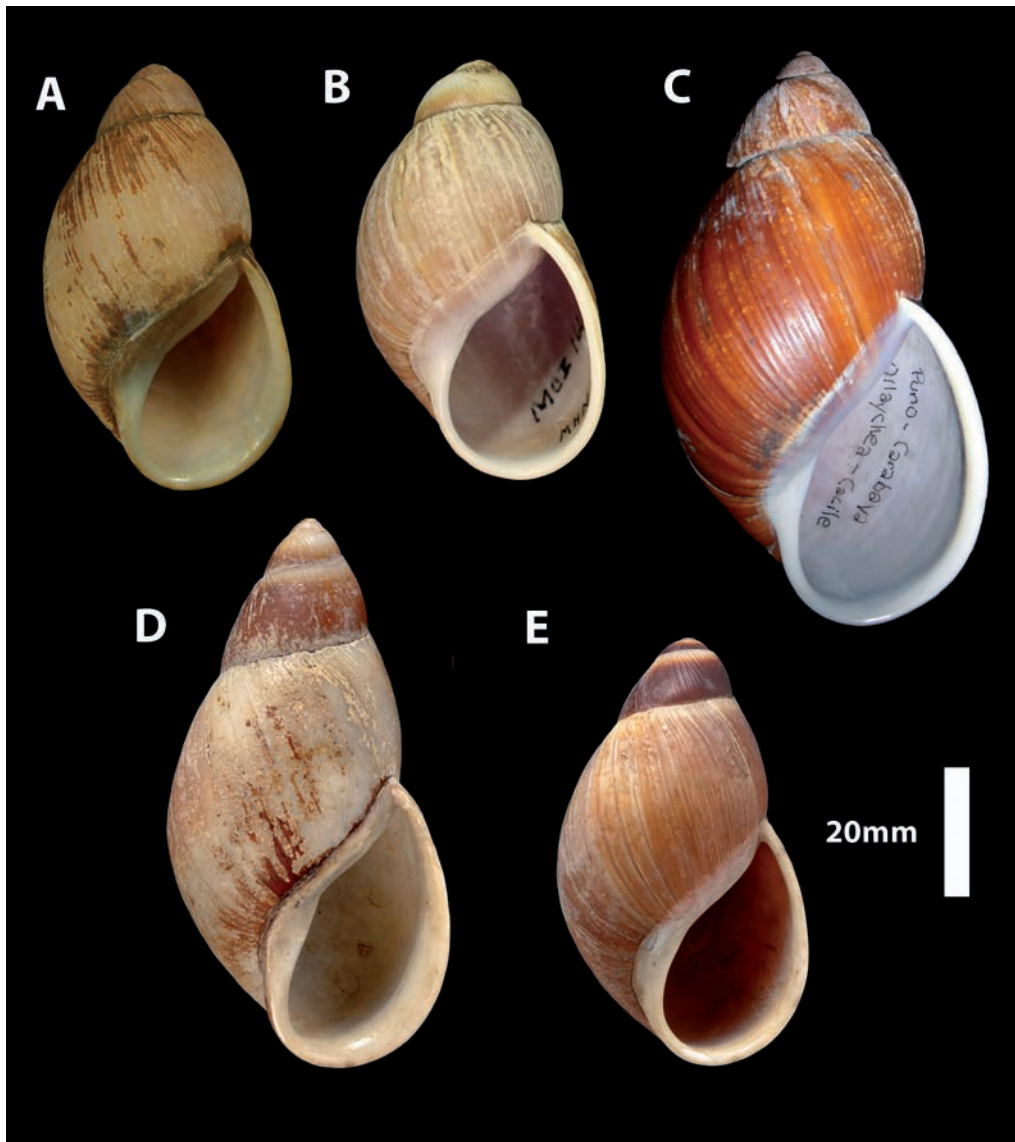
Con la finalidad de realizar la discriminación de las subespecies de *Megalobulimus leucostoma* se realizó un análisis morfométrico de las conchas, tanto del material colectado como de los custodiados en colecciones. Para esto se realizaron dos evaluaciones en morfometría, la clásica y la geométrica. Fueron evaluados 83 individuos adultos, considerados así por el engrosamiento del peristoma, 71 de los cuales corresponden a *M. leucostoma leucostoma*, tres a *M. leucostoma lacunosus*, cinco a *M. leucostoma weyrauchi*, dos a *Helix mathiusii* y dos a *Helix lacunosus*.

Para la morfometría clásica, se emplearon seis variables continuas las que fueron obtenidas a través de imágenes digitales de la concha de los especímenes en el programa IMAGEJ (versión 1.63, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Las variables consideradas fueron: Altura de la concha (**AC**), diámetro mayor de la concha (**DM**), largo de la abertura (**LB**), ancho de la abertura (**AB**), espira (**ESP**) y posición del diámetro mayor (**PDM**) (Figura 2). Las seis variables fueron sometidas a análisis de componentes principales (ACP) mediante el programa PAST ver 3.0 (Hammer et al. 2001). Los datos fueron transformados a logaritmos previamente.

Para la morfometría geométrica se consideraron 12 *landmarks*, los cuales fueron digitalizados con el programa TpsDig ver. 2.16 (Rohlf 2010) (Fig. 3). Estos fueron considerados en base al trabajo de Schilthuizen y Haase (2010). Las coordenadas fueron ingresadas al programa MorphoJ 1.05 (Klingenberg 2011), realizándose antes un alineamiento de las coordenadas iniciales usando el método generalizado ortogonal de Procrustes (Rohlf & Slice 1990), se generó una matriz de covarianza, la que permitió realizar el análisis de componentes principales. Debido al número desbalanceado de individuos de cada subespecie, se consideraron las tres primeras componentes principales para realizar un

**Tabla 1.** Procedencia de los especímenes empleados en el presente estudio.

Subespecie	Museo de custodia	Procedencia	Coordenadas	# de ejemplares
<i>Megalobulimus leucostoma leucostoma</i>	MUSM	Perú, Cusco, La Convención, Pavayoc	12°51'39.52"S - 2°41'13.9"W	13
		Perú, Cusco, La Convención, Huyro	12°58'39.5"S - 72°33'21.9"W	4
		Perú, Cusco, La Convención, Santa María	13°00'16.2"S - 72°37'57.1"W	8
		Perú, Cusco, La Convención, Chaullay	13°00'34.6"S - 72°38'34.9"W	2
		Perú, Cusco, La Convención, Sambaray	12°51'49.50"S - 72°42'16.2"W	18
		Perú, Cusco, La Convención, Echarate	12°46'51.0"S - 72°33'59.7"W	10
		Perú, Cusco, La Convención, Potrero	12°53'41.0"S - 72°43'42.6"W	4
		Perú, Cusco, La Convención, Uchumayo	12°57'26.0"S - 72°40'25.8"W	1
		Perú, Cusco, La Convención, Huayanay	12°48'40.3"S - 72°38'42.6"W	6
		Perú, Cusco, La Convención, Santa Teresa	13°06'17"S - 72°37'51"W	4
<i>Megalobulimus leucostoma lacunosus</i>	MUSM	Perú, Cusco, Calca, Lares	13°05'S - 72°13'W	2
		Perú, Puno, Chacaneque	13°18'53"S - 70°17'08"W	2
<i>Megalobulimus leucostoma weyrauchi</i>	ANSP	Perú, Madre de Dios, Tambopata	14°14'S - 89°11'W	1
		Peru, Cusco	—	1
<i>Helix mathiusii</i>	MCZ	Perú, Cusco	—	4
		Perú, Cusco	—	2
<i>Helix lacunosus</i>	NHM-UK	Bolivia, Cochabamba, Tutulima	—	2



**Figura 1.** Subespecies de *Megalobulimus leucostoma* en vista frontal.

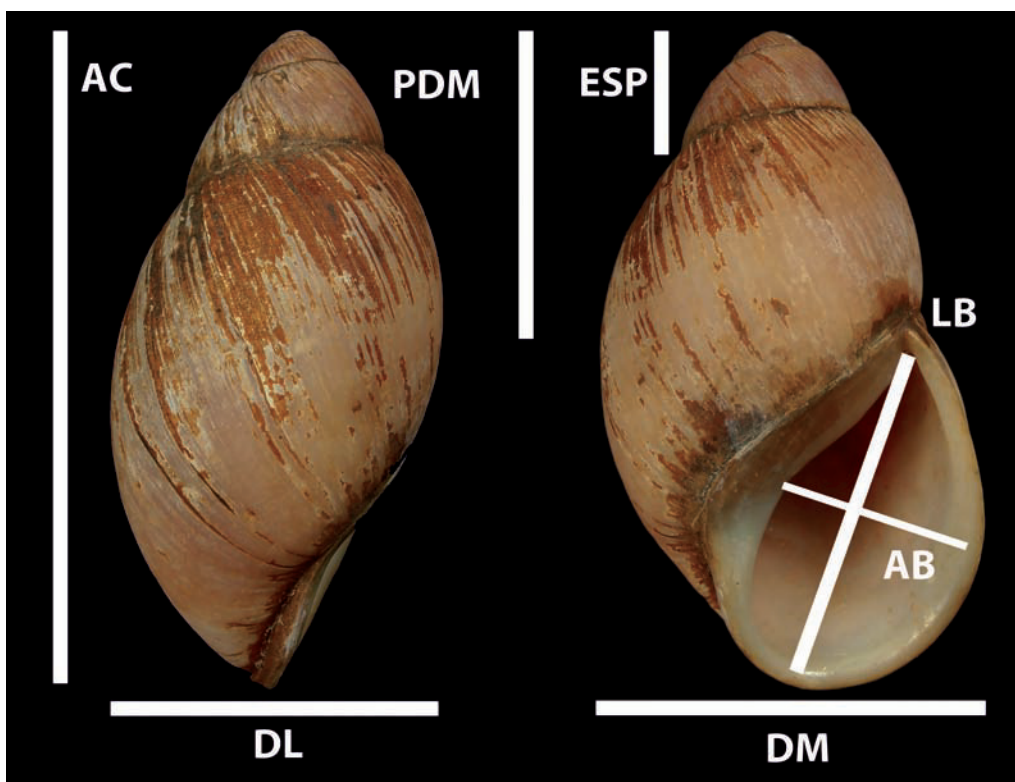
(A) *M. leucostoma* procedente de Pavayoc, Cusco.

(B) Holotipo de *M. leucostoma weyrauchi*, MCZ 166295. Cortesía del MCZ.

(C) *M. leucostoma lacunosus* procedente de Carabaya, Puno.

(D) *Helix lacunosus*, sinonimia para *M. leucostoma lacunosus*, sintipo procedente de la localidad de Tutulima, Cochabamba, Bolivia, NHMUK 1854.12.4.213. Cortesía del NHMUK.

(E) *Helix mathiusii*, sinonimia para *M. l. leucostoma*, sintipo procedente de Perú, NHMUK 1854.12.4.214. Cortesía del NHMUK.



**Figura 2.** Variables de la concha consideradas para el análisis morfométrico clásico.

AC: Altura de la concha.

DM: Diámetro mayor de la concha.

LB: Largo de la abertura.

AB: Ancho de la abertura.

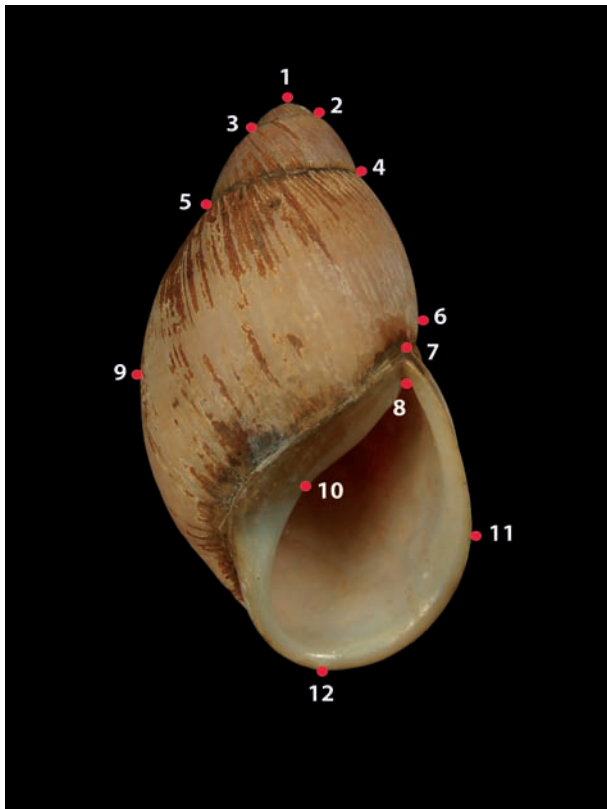
ESP: Espira.

PDM: Posición del diámetro mayor.



**Tabla 2.** Estadísticos básicos para las seis medidas obtenidas a partir de la concha de las subespecies de *Megalobulimus leucostoma*.

Medidas	<i>M. l. leucostoma</i> (n=71)	<i>M. l. lacunosus</i> (n=3)	<i>M. l. weyrauchi</i> (n=5)	<i>Helix mathiusii</i> (n=2)	<i>Helix lacunosus</i> (n=2)
Altura de la concha	70.53 ± 3.66	87.38 ± 1.88	62.1 ± 3.4	64.16 ± 1.17	85.31 ± 0.87
Diámetro mayor de la concha	39.31 ± 2.4	47.82 ± 2.33	36.96 ± 1.03	39 ± 0.36	43.53 ± 0.93
Largo de la abertura	34.36 ± 2.45	43.67 ± 0.98	37.75 ± 2.75	32.60 ± 0.36	40.08 ± 0.08
Ancho de la abertura	18.5 ± 1.27	22.82 ± 1.64	20 ± 1	18.28 ± 0.33	21.5 ± 0.22
Espira	16.99 ± 1.44	23.58 ± 0.99	14.56 ± 0.66	13.15 ± 0.3	23.51 ± 0.69
Posición del diámetro mayor	37 ± 2.23	34.36 ± 1.31	37.78 ± 2.5	34.36 ± 1.31	47.22 ± 0.89

**Figura 3.** Landmarks utilizados en el estudio basados en Schilthuizen & Haase (2010).

MANOVA no paramétrico mediante el programa PAST ver 3.0. Este MANOVA se realizó con el objetivo de comparar las medias multivariadas para las tres subespecies considerando el índice de distancia Euclidiana y de Mahalanobis. Finalmente se realizó un análisis discriminante para mejorar la distinción entre los grupos evaluados a partir de las tres primeras componentes principales donde ya se vería reflejada la variación original de los landmarks. Para estos análisis se consideraron tres grupos basados en su descripción como subespecies, estos fueron: grupo 1 (*M. l. leucostoma* + *Helix mathiusii*); grupo 2 (*M. l. lacunosus* + *Helix lacunosus*) y grupo 3 (*M. l. weyrauchi*).

Los datos de coordenadas geográficas procedentes de las colectas y del material de colección fueron considerados para modelar un mapa de distribución en el programa Arc Map 10. Se consideró la clasificación de zonas de vida de Holdridge (1947) para caracterizar el hábitat de las especies colectadas.

## Resultados

**Morfometría clásica.**- Se calcularon los estadísticos básicos (media y desviación estándar) para las seis medidas propuestas (Tabla 2). Luego éstas fueron normalizadas y sometidas al Análisis de Componentes Principales (ACP). Las dos primeras componentes explicaron un 92.964% de la varianza total. La primera componente acumuló un 71.169% de la varianza total y la variable que explicó mejor dicha varianza fue la longitud de la espira de la concha. La segunda componente acumuló 21.795% de la variabilidad total. La variable que mejor explicó la variación en esta componente también fue la longitud de la espira seguida del ancho de la apertura (Tabla 3).

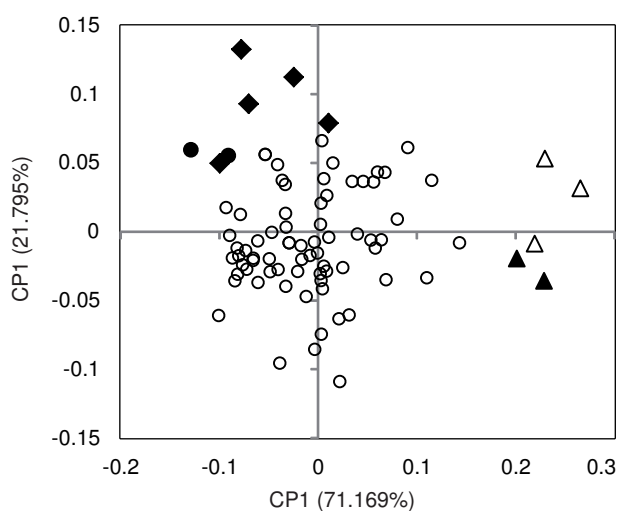
En la gráfica de dispersión de puntos de las primeras dos componentes principales (Fig. 4), se observa la gran variabilidad de los individuos de *M. leucostoma*, dentro de este morfoespacio se ubican los ejemplares tipo de *Helix mathiusii* y de *M. leucostoma weyrauchi*. Mientras que, por fuera de este morfoespacio, se sitúan *M. leucostoma lacunosus* (Puno) y los ejemplares tipo de *Helix lacunosus* como las conchas de mayores proporciones.

Se observó una gran variación en el tamaño de *M. leucostoma leucostoma*, donde los ejemplares tipo de *M. leucostoma weyrauchi* y de *H. mathiusii* se ubican junto con las de menor tamaño.

**Morfometría geométrica.**- A partir del análisis de componentes principales para 24 coordenadas de los 12 landmarks se obtuvieron 20 componentes principales (PC). Las primeras dos componentes explicaron el 48.748% de la varianza total, la primera con 35.862% y la segunda con 12.88% (Fig. 5). En la componente principal 1, la forma varió desde conchas más anchas, de protoconcha corta y de apertura más grande en su

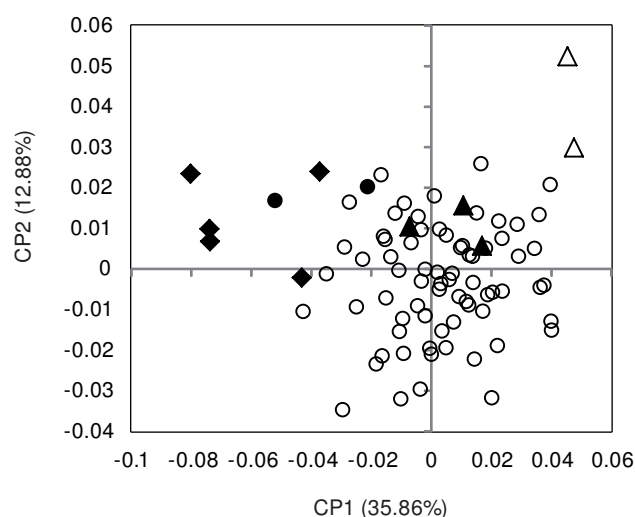
**Tabla 3.** Matriz de estructura del análisis de componentes principales para 83 conchas de las especies en estudio.

Variables	Componentes principales		
	1	2	3
Altura de la concha	0.39254	0.001773	0.40445
Diámetro de la concha	0.29732	0.33467	0.70615
Espira	0.59436	-0.69691	-0.15362
Posición del diámetro mayor	0.412	0.024925	-0.0189
Altura de la apertura	0.36456	0.41241	-0.45981
Ancho de la apertura	0.31874	0.48126	-0.31999
Total de varianza explicada	71.169%	21.795%	2.69%



○ *M. l. leucostoma*    ▲ *Helix lacunosus*    ◆ *M. l. weyrauchi*  
● *Helix mathusii*    △ *M. l. lacunosus*

**Figura 4.** Análisis de componentes principales basado seis medidas obtenidas a partir de 83 conchillas para la discriminación entre las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma* y ejemplares tipo. El porcentaje de variación para cada componente se indica entre paréntesis.



○ *M. l. leucostoma*    △ *Helix lacunosus*    ◆ *M. l. weyrauchi*  
● *Helix mathusii*    ▲ *M. l. lacunosus*

**Figura 5.** Análisis de componentes principales basado en variables de forma para la discriminación entre las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma* y ejemplares tipo. El porcentaje de variación para cada componente se indica entre paréntesis.

extremo más negativo a conchas más delgadas, con protoconcha más pronunciada y de apertura más pequeñas en su porción positiva. Los *landmarks* que acumularon mayor varianza para esta componente estuvieron relacionados con la espira (*landmarks* 1 y 2) (Tabla 4). En el caso de la componente principal 2, se observan conchas con espira corta en su extremo más negativo, cuya forma varió a conchas con espira más pronunciada en el extremo más positivo. Al igual que la componente principal 1, los *landmarks* que acumularon mayor varianza para esta componente fueron los *landmarks* 1 y 2 (Tabla 4).

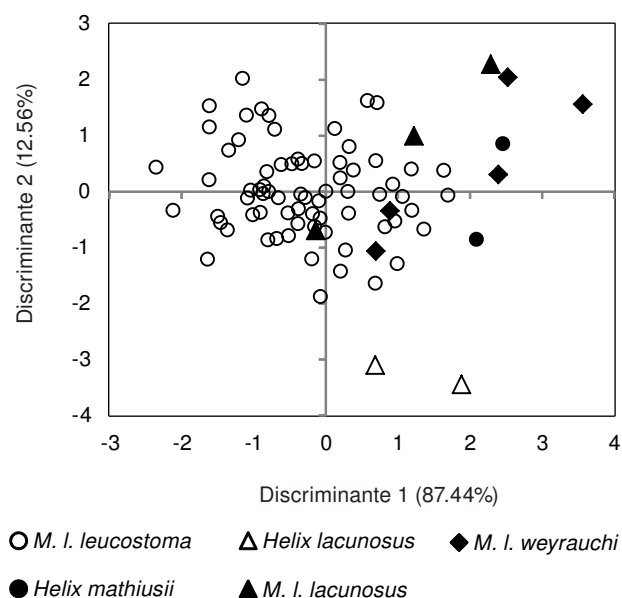
En el gráfico se observa que *M. l. leucostoma* presenta diversas formas que abarcan desde formas delgadas con espira aguda hasta formas semiovaladas con espiras obtusas. Los individuos de *M. l. lacunosus* se ubican preferentemente dentro de los cuadrantes correspondientes a las conchas con forma delgada y espira más pronunciada, siendo los individuos tipo de *H. lacunosus* aquellos que se diferenciaron mejor por su forma más delgada. Por otro lado, los individuos de *M. l. weyrauchi* y *H. mathusii* se diferenciaron como los ejemplares con ápex más corto y vuelta corporal más expandida sin mostrar mucha diferenciación del morfoespacio de *M. leucostoma leucostoma* (Fig. 5).

A partir de los valores para los tres primeros componentes principales se desarrolló un análisis PERMANOVA o MANOVA no paramétrico. Para esto se consideraron tres grupos basados en cada subespecie de *M. leucostoma*: grupo 1 (*M. l. leucostoma* + *Helix mathusii*); grupo 2 (*M. l. lacunosus* + *Helix lacunosus*) y grupo 3 (*M. l. weyrauchi*). PERMANOVA no reveló diferencias significativas entre los tres grupos (distancia Euclidiana:  $F = 5.728$ ,  $P < 0.001$ ; distancia de Mahalanobis:  $F = 4.951$ ,  $P < 0.001$ ). Sin embargo, si se examinan los valores considerando pares de grupos es posible observar, en el caso de la distancia Euclidiana, una clara similitud entre las subespecies *leucostoma* y *weyrauchi*. Mientras que en el caso de los pares *M. l. lacunosus*

**Tabla 4.** Matriz de estructura de las cuatro primeras componentes principales para las coordenadas de los 12 *landmarks* utilizados.

	PC1	PC2	PC3	PC4
x1	-0.012821	0.319020	-0.096432	0.003716
y1	0.498506	0.210085	0.042753	0.164806
x2	0.079255	0.332015	-0.035472	0.089456
y2	0.291036	-0.078494	0.005197	-0.002814
x3	-0.184434	0.080919	-0.184978	-0.161165
y3	0.071813	0.028658	-0.135326	-0.060551
x4	0.081609	0.129819	0.042635	0.067133
y4	-0.022849	-0.284958	-0.052685	-0.093376
x5	-0.069673	-0.219091	-0.051349	-0.088025
y5	-0.220655	-0.206762	-0.106868	-0.201052
x6	-0.031914	-0.199290	-0.000729	0.134719
y6	-0.292434	0.204729	0.157102	0.473087
x7	-0.114788	-0.263246	-0.058426	0.151766
y7	-0.338916	0.042351	-0.057242	0.126941
x8	-0.014239	-0.256633	-0.308946	0.116012
y8	-0.287791	0.058757	-0.166630	-0.098571
x9	0.251628	-0.298582	0.327527	0.105137
y9	-0.154369	-0.102215	0.694639	-0.125136
x10	0.160123	0.013503	0.256303	-0.250565
y10	-0.064606	0.215789	0.058906	-0.121606
x11	-0.070387	0.076755	0.053466	-0.411112
y11	0.265691	0.158838	-0.226640	-0.373852
x12	-0.074360	0.284813	0.056402	0.242926
y12	0.254573	-0.246777	-0.213207	0.312123





**Figura 6.** Análisis discriminante basado en las tres primeras componentes principales obtenidas a partir de variables de forma para la discriminación entre las tres subespecies de *Megalobulimus leucostoma* y ejemplares tipo. El porcentaje de variación para cada factor discriminante se indica entre paréntesis.

- *M. l. leucostoma* y *M. l. lacunosus* - *M. l. weyrauchi* la similitud es no significativa. Para el caso de la distancia de Mahalanobis, es posible observar que existe una similitud significativa entre los pares *M. l. lacunosus* - *M. l. leucostoma* y *M. l. leucostoma* - *M. l. weyrauchi* (Tabla 5). Por último, el análisis discriminante demuestra que aún es posible notar que aunque existe superposición entre los morfoespacios de los grupos, es la componente principal 2, la que contribuye con una ligera diferenciación entre los grupos 2 y 3 del grupo 1 (*M. l. leucostoma* + *Helix mathiusii*) (Fig. 6).

**Distribución geográfica.** - Los datos de distribución geográfica producto de las colectas y de la colecciones científicas resaltan el carácter endémico para la subespecie *M. l. leucostoma*, la cual se ve restringida a las provincias de La Convención y Calca, en el departamento de Cusco (Fig. 7). El área donde fue colectada

esta subespecie corresponde a la zona de vida “Bosque Húmedo tropical” (bh-t) según el sistema de Holdridge (Holdridge 1947). En la provincia de La Convención, las localidades más distantes fueron Huyro y Echarate las cuales están separadas por 70 kilómetros. Todas las localidades se encuentran próximas al Río Vilcanota (Urubamba), excepto la localidad de Santa Teresa. El punto de colecta a mayor altitud fue en Huyro, la cual también corresponde a la localidad más al sur dentro de la provincia de La Convención. En el caso de *M. l. lacunosus*, fue colectada únicamente en la localidad de Chacaneque en Puno, la cual corresponde a la zona de vida “Bosque húmedo tropical” (bh-t). Para *M. l. weyrauchi*, solo se menciona “Cusco” tanto en la descripción original como en las etiquetas de los ejemplares tipo custodiados en la colección del MCZ.

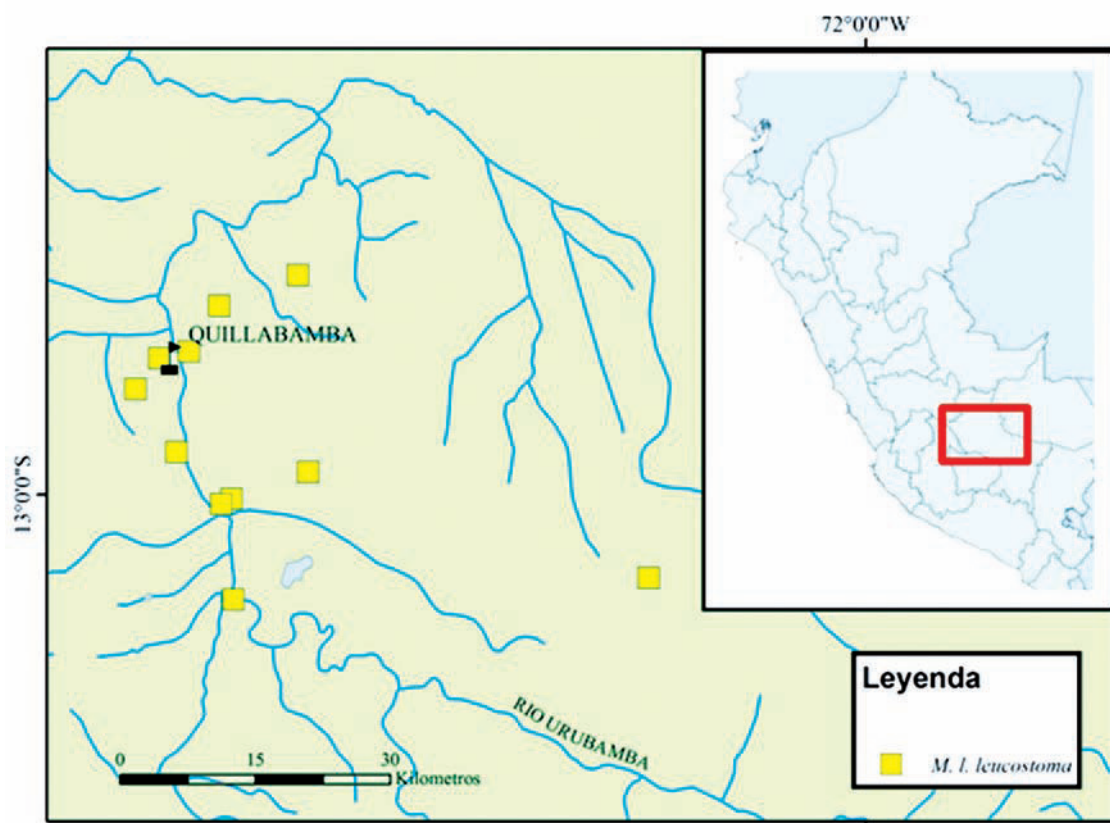
## Discusión

Inicialmente las subespecies del complejo *M. leucostoma* habían sido descritas como especies independientes, *Bulimus leucostoma* Sowerby, 1835 y *Helix lacunosus* d'Orbigny, 1835. La diagnosis de estas dos especies se basó en características de la concha tales como forma, tamaño de la espira, características de la superficie, vueltas nepiónicas, entre otras. Además que fueron descritas para Perú (Cusco) y Bolivia (Cochabamba) respectivamente. Bequaert (1948) fue quién en su revisión de la Familia Strophocheilidae consideró a *H. lacunosus* como una subespecie de *Strophocheilus* (*Megalobulimus*) *leucostoma*. Al año siguiente, Bequaert (1949) describió a *Strophocheilus* (*Megalobulimus*) *leucostoma weyrauchi* a partir de 9 individuos (el holotipo y 8 paratipos). En comparación con el típico *Strophocheilus leucostoma* (ahora *Megalobulimus leucostoma*), Bequaert describió esta subespecie como más pequeña y proporcionalmente más ancha a nivel de la vuelta corporal. El presente estudio abarcó localidades citadas en la literatura para *M. leucostoma* y nuevas localidades en el Perú, además de incluir especímenes tipo para una mejor caracterización de las subespecies que componen a *M. leucostoma*.

Los métodos de morfometría tradicional referidos a medidas lineales básicas (como ancho y altura) son ampliamente usados para comparar la forma de diferentes organismos, sin embargo, esta información resulta limitada (Smith & Hendricks 2013). Uno de los principales problemas dentro del género *Megalobulimus* es la constancia y homogeneidad en sus

**Tabla 5.** P-valores de pares de grupos para las tres subespecies producto del MANOVA no paramétrico a partir de los valores de las tres primeras componentes principales basadas en variables de forma. Se considera valores de distancia Euclidiana y de Mahalanobis. El asterisco (\*) indica los valores significativos.

Distancia Euclidiana			
Subespecies	<i>M. l. leucostoma</i>	<i>M. l. lacunosus</i>	<i>M. l. weyrauchi</i>
<i>M. l. leucostoma</i>		0.0673	0.0003*
<i>M. l. lacunosus</i>	0.0673		0.2692
<i>M. l. weyrauchi</i>	0.0003*	0.2692	
Distancia de Mahalanobis			
Subespecies	<i>M. l. leucostoma</i>	<i>M. l. lacunosus</i>	<i>M. l. weyrauchi</i>
<i>M. l. leucostoma</i>		0.0167*	0.0002*
<i>M. l. lacunosus</i>	0.0167*		0.7667
<i>M. l. weyrauchi</i>	0.0002*	0.7667	



**Figura 7.** Mapa de procedencia del material evaluado (Suroriente del Perú) para *M. leucostoma leucostoma* en el departamento de Cusco. Los ríos están diferenciados como líneas en azul.

caracteres conculiológicos y anatómicos (Leme 1973). El caso del complejo *M. leucostoma* es un claro ejemplo en el cual la variabilidad intraespecífica es alta, al menos al referirse a los caracteres conculiológicos. Por este motivo se abordaron dos diferentes metodologías en morfometría para diferenciar entre las subespecies de este complejo.

Los resultados obtenidos a partir de ambos análisis de morfometría proveerían escenarios contradictorios. Sin embargo, es necesario interpretarlos de manera integrada. El análisis multivariado de las medidas lineales nos permitió discriminar en base a tamaño y forma, siendo diferenciadas las subespecies *M. l. leucostoma* y *M. l. lacunosus* en base a sus diferentes tamaños y características de la espira. Además, se destaca el amplio rango de variación que presenta *M. l. leucostoma* y por esta razón no se consiguió una discriminación significativa de *M. l. weyrauchi*. En el caso de la morfometría geométrica, la cual considera la forma, también demostró que *M. l. leucostoma* no solo presenta amplia variabilidad en los tamaños sino también en las formas. Este morfoespacio de forma incluyó a *M. l. lacunosus*, ya que algunas conchas a pesar de tener un tamaño menor al promedio de *M. l. lacunosus*, presentan una forma similar. Al igual que en la morfometría clásica, no se encontró una diferenciación significativa de *M. l. weyrauchi*. Ambos análisis demuestran que esta subespecie pertenece al gran rango de variabilidad de *M. l. leucostoma* tanto por tamaño como por forma. Mientras que *M. l. lacunosus* aun presentando una forma parecida, la diferencia de tamaño con *M. l. leucostoma* es marcada. Asimismo, en otros estudios morfológicos y moleculares que estamos desarrollando se reafirma la distancia entre *M. l. lacunosus* y *M. l. leucostoma*.

En el caso de *M. l. weyrauchi*, fue descrita para Cusco sin más especificaciones por Bequaert (1949), no proporcionó datos exactos de su distribución. Las únicas localidades de Cusco donde se han reportado especímenes de *Megalobulimus* corresponden a las provincias de La Convención y Calca (Flórez 1970), ambas con diferentes zonas de vida. Además, las características conculiológicas de la descripción no son suficientes para justificar su estatus como subespecie. Los análisis morfométricos clásico y geométrico lo incluyen o lo acercan, respectivamente, al morfoespacio de *M. l. leucostoma*. Además, el MANOVA y el análisis discriminante no proveen un sustento suficiente como para distinguir a *M. l. weyrauchi* como una subespecie, sino más bien que constituye parte de la variabilidad intrapoblacional de *M. leucostoma leucostoma*.

La diversidad de formas y tamaños observados para *M. l. leucostoma* no se encuentran separadas geográficamente. Por el contrario, en una misma población es posible observar no sólo diferentes tamaños y formas sino también ejemplares levógiros (Blume 1920).

A partir de los resultados, *M. leucostoma lacunosus* debería recuperar su estatus de especie, quedando como *Megalobulimus lacunosus* (d'Orbigny, 1835). Por el contrario, *M. l. weyrauchi* (Bequaert, 1949) constituiría una variación dentro de la gran gama de formas y tamaños de *M. leucostoma*, constituyéndose en un sinónimo de ésta.

### Agradecimientos

Agradecemos a André Ampuero por su colaboración en el análisis morfométrico y a John Ablet (NHMUK) y Adam Baldinger (MCZ) por proveer imágenes digitales de los ejemplares tipo.

## Literatura citada

- Bequaert J.C. 1948. Monograph of the Strophocheilidae, a Neotropical family of terrestrial mollusks. Bulletin of the Museum of Comparative Zoology 100:1-210.
- Bequaert J. C. 1949. Three new south american land snails (Strophocheilus, Thaumastus, Drymaeus). The Nautilus 62:113 - 115.
- Blume W. 1920. Vier neue Landschnecken. Archiv für Molluskenkunde 52:127-130.
- Borda V. & R. Ramírez. 2013. Re-characterization of the Red-lip *Megalobulimus* (Gastropoda: Strophocheilidae) from Peru with description of a new species. Zoologia (Curitiba) 30: 675-691. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702013005000008>.
- Bouchet P. & J.-P. Rocroi. 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. Malacologia 47:397pp.
- Flórez A. 1970. Moluscos de interés económico del Oriente Cusqueño (Familia Acavidae). Publicaciones del Departamento Académico de Zoología y Entomología - Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco 1:27-31.
- Hammer Ø.; D. Harper & P. Ryan. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. . Paleontologia Electronica 4:1-9.
- Holdridge L. R. 1947. Determination of World Plant Formations from Simple Climatic Data. Science 105:367-368. doi: 10.1126/science.105.2727.367
- Klingenberg C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources 11:353-357. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x
- Leme J.L.M. 1973. Anatomy and systematics of the Neotropical Strophocheiloidea (Gastropoda, Pulmonata) with the description of a new family. Arquivos de Zoologia 23:295-337.
- Ramírez R. & S. Cáceres. 1991. Caracoles terrestres (Mollusca, Gastropoda) comestibles en el Perú. Boletín de Lima (Peru). (Set 1991) 67-74.
- Ramírez, R.; C. Paredes y J. Arenas. 2003. Moluscos del Perú. Revista de Biología Tropical 51:225-284.
- Rohlf F.J. & D. Slice. 1990. Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. Systematic Zoology 39:40-59. doi: 10.2307/2992207
- Rohlf F.J. 2010. tpsDig, version 2.16. Stony Brook University.
- Schilthuizen M. & M. Haase. 2010. Disentangling true shape differences and experimenter bias: are dextral and sinistral snail shells exact mirror images? Journal of Zoology 282:191-200. doi:10.1111/j.1469-7998.2010.00729.x.
- Simone L.R.L. 2006. Land and Freshwater Molluscs of Brazil. FA-PESP/EGB. 390 pp.
- Smith U.E. & J.R. Hendricks. 2013. Geometric Morphometric Character Suites as Phylogenetic Data: Extracting Phylogenetic Signal from Gastropod Shells. Systematic Biology 62:366-385. doi: 10.1093/sysbio/syt002.
- Suvorov N.A. 2002. Prospects for Studies of Morphological Variability of Land Pulmonate Snails. Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences 29:455-467.